Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der
Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. L. Koslowski

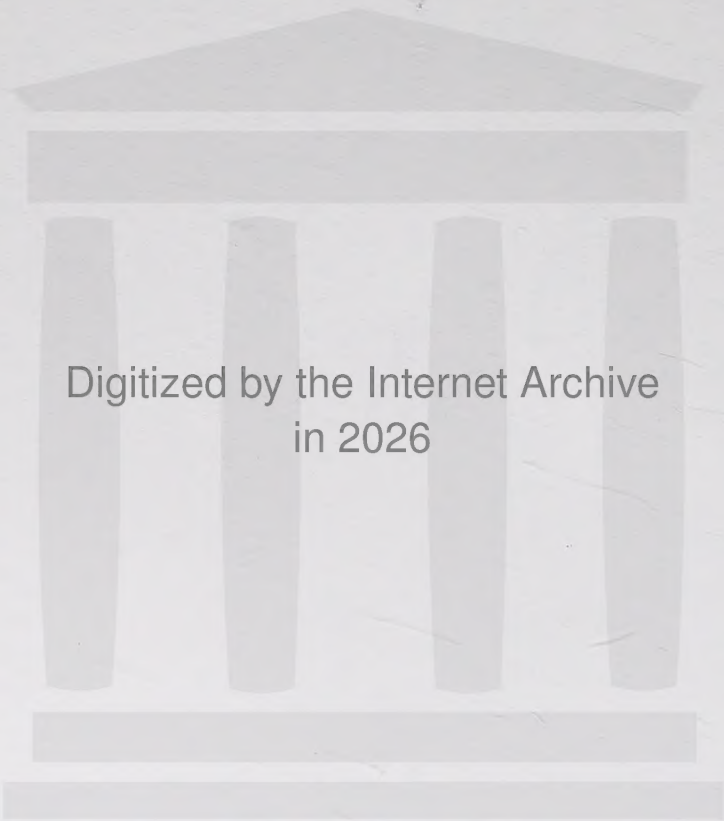
Chondrogenese in Mesenchymzellkulturen unter dem Einfluß von demineralisierter Knochenmatrix

INAUGURAL—DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
ELISABETH BÜRGER geb. Buchli
aus Chur/Schweiz

1984



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547612_0020

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der
Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. L. Koslowski

Chondrogenese in Mesenchymzellkulturen unter dem Einfluß von demineralisierter Knochenmatrix

INAUGURAL—DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
ELISABETH BÜRGER geb. Buchli
aus Chur/Schweiz

1984

Dekan:	Professor Dr. D. Plester
1. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. Dr. K.H. Schmidt
2. Berichterstatter:	Professor Dr. P. Berg

---

gedruckt bei H.- J. Köhler · Reprografischer Betrieb · Tübingen

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S Seite

1.	EINLEITUNG	5
	ALLGEMEINER TEIL	8
2.	KULTIVIERUNG UND IDENTIFIZIERUNG VON MUSKEL-BZW. MESENCHYMZELLEN UND KNOCHEN-ZELLEN	8
2.1	Historische Übersicht zur Entwicklung der Zellkulturverfahren	8
2.2	Genese der Muskel- und Knochenzellen	11
2.3	Struktur des Muskelgewebes und Kultivierung der Muskelzellen	15
2.3.1	Struktur des embryonalen Skeletmuskels in situ	15
2.3.2	Struktur der explantierten Muskelfragmente und ihr Verhalten in Kultur	16
2.3.3	Kulturtechniken	18
2.4	Struktur von Knochen und Knochenzellen und deren Kultivierung	19
2.4.1	Physiologie und Biochemie der Knochenbildung	20
2.4.2	Struktur und Verhalten der einzelnen Zelltypen	21
2.4.3	Das Knorpelgewebe	23
2.4.4	Osteogenese in vitro	25
2.4.5	Kulturtechniken	32
2.4.6	Probleme und Beobachtungen bei der Kultivierung isolierter Knochenzellen	33
2.5	Vergleich von Mesenchymzellen und Knochenzellen	34

Seite

3. CHONDROGENESE IN MESENCHYM-ZELLKULTUREN UNTER DEM EINFLUSS DEMINERALISIERTER KNOCHENMATRIX 38
3.1 Herstellung und Bedeutung der KM 38
3.2 Methoden zur Anwendung der KM 39
3.3 Ergebnisse zur Wirkung der KM 42
3.3.1 Wirkung in vitro 42
3.3.2 Wirkung in vivo 45
3.3.3 Wirkung auf andere Zellen mesodermaler Abstammung 47
3.4 Biochemische Nachweismethoden der Chondrogenese 47
3.4.1 Glycosaminglykansynthese 47
3.4.2 Nachweis der Zelldifferenzierung durch Bromodeoxyuridine-Inhibition 49
3.4.3 Alkalische Phosphatase-Aktivität 50
3.5 Zusammenfassung vorliegender Ergebnisse zum induzierten Korpel- bzw. Knochenwachstum 51

EXPERIMENTELLER TEIL 53

4. METHODE 53
4.1 Material 53
4.2 Verhütung von Kontamination 57
4.3 Anlegen von Primärkulturen 57
4.3.1 Gewinnung von Mesenchymzellen 57
4.3.2 Gewinnung von Osteoblasten 58
4.3.3 Aufbereitung der Muskel- und Knochenfragmente 59
4.4 Kultivierung und Subkultivierung der Zellen 59
4.5 Einfrieren von Zellen 61
4.6 Auftauen von Zellen 61

Seite

4.7 Vitalfärbung 61
4.8 Zellzahlbestimmung 62
4.9 Enzymatische Bestimmung der alkalischen Phosphatase 63
4.10 Proteinbestimmung nach Lowry 65
4.11 Wachstumskruven in Abhängigkeit der Serumkonzentration 66
4.12 Färbungen zur Zellidentifikation 66
4.12.1 Panoptische Färbung 66
4.12.2 Osmiumfixierung 67
4.12.3 Alkalische Phosphatase-Färbung (mit Azokupplungsmethode) 68
4.13 Einsetzen der Testsubstanz OCG 69

5 ERGEBNISSE 70
5.1 Beobachtungen beim Anlegen der Primärkulturen 70
5.1.1 Abhängigkeit des Zellwachstumbeginns von der Größe der Gewebestücke am Beispiel von Mesenchymzellen 70
5.1.2 Abhängigkeit des Zellwachstumbeginns von der Trypsinkonzentration am Beispiel von Mesenchymzellen 71
5.1.3 Unterschied des Wachstums von Muskel- und Knochenzellen unter gleichen Bedingungen 72
5.2 Beobachtungen bei der Subkultivierung 73
5.2.1 Anhaften der Zellen 73
5.2.2 Kontakthemmung 75
5.2.3 Aussaatdichte 77
5.2.4 Lebensfähigkeit nach Trypsinbehandlung 78
5.2.5 Maximale Lebenslänge 78
5.3 Entwicklung der Zellkulturen ohne Subkultivierung 79
5.3.1 Mesenchymzellen 79
5.3.2 Osteoblasten 80

Seite

5.3.3 Bildung von Knochengewebe aus nicht subkultivierten Osteoblasten bei 2 % CO_2 81

5.4 Alkalische Phosphatase-Aktivität von Mesenchymzellen und Osteoblasten 86

5.5 Wachstum der Zellen in Abhängigkeit verschiedener Serumkonzentrationen 90

5.6 Identifikation der Zelltypen mittels verschiedener Färbemethoden 95

5.7 Wirkung der Testsubstanz OCG auf die Mesenchymzellen 101

6. DISKUSSION 106

7. ZUSAMMENFASSUNG 114

8. LITERATURVERZEICHNIS 116

ABKÜRZUNGEN

BG.J.b.FJ	=	Biggers Medium modifiziert nach Fitton-Jackson
BMG	=	Bone Morphogenetic Gelatice
BMP	=	Bone Morphogenetic Protein
BrdU	=	Bromodeoxyuridine
CHS	=	Chondroitinschwefelsäure
DMSo	=	Dimethylsulfoxid
DNS	=	Desoxyribonukleinsäure
EM	=	Elektronenmikroskop
ER	=	Endoplasmatisches Retikulum
FKS	=	Fötales Kälberserum
Glu	=	Glutamin
HA	=	Hyaluronsäure
KF	=	Kulturflasche
KM	=	Knochenmatrix
LM	=	Lichtmikroskop
OCG	=	Osteogenin Containing Gelatine
P/S	=	Penicillin/Streptomycin

1. E I N L E I T U N G

Schon vor über 75 Jahren wurde festgestellt, daß bei Säugetieren bestimmte Verletzungen von Bindegewebe in eine Bildung von Knorpel- und Knochengegewebe an ungewöhnlichen anatomischen Orten ausarteten (AINSWORTH ET AL 1977). Auch aufgrund operativer Eingriffe kam es zu solchen phänotypischen Veränderungen beschädigter Bindegewebszellen (ANASTASSIADES ET AL 1978). Um diese Beoabachtungen zu erklären, wurde angenommen, daß bei erwachsenen Tieren einige Fibroblasten in einem undifferenzierten Stadium verweilen und sich unter bestimmten Stimuli in Knorpel- und Knochenzellen differenzieren (AINSWORTH ET AL 1977). Als ein Stimulus einer solchen Differenzierung wurde 1965 von Urist demineralisierte Knochenmatrix (KM) verwendet. Tatsächlich konnte er 6 - 8 Wochen nach Implantation der Matrix in die Abdominalmuskulatur einer Ratte eine Knochenbildung im Muskel feststellen.

Für eine genauere Untersuchung der Auslösungsbedingungen und -vorgänge sowie der auftretenden zellulären Veränderungen können Zellkulturen als Modell dienen. In Arbeiten hierzu (z. B. NOGAMI UND URIST 1970, BASSET 1962) wurden als induzierbare Zellen undifferenzierte mesenchymale aus der Muskulatur sowie undifferenzierte Bindegewebszellen (Fibroblasten) verwendet. Induzierte Differenzierungsvorgänge konnten nach Beigabe von Knochenmatrix beobachtet und teilweise identifiziert werden. Das Knochenwachstum war dabei jedoch erst in Vorstadien erkennbar (Knorpelbildung). Die unterschiedlichen Resultate der Induktion in der Literatur weisen auf die Empfindlichkeit des Vorganges gegenüber den Kultur- und Umgebungsparametern bzw. auf die ungeklärte Bedeutung einzelner Einflußgrößen hin. Auch die induzierende

Substanz ist bisher nicht eindeutig bestimmt. SAMATH UND REDDI (1981) schreiben der intakten Struktur der KM biologische Aktivität zu, während URIST ET AL (1983) in einem Modell den molekularen Effekt der KM nachweisen. Es gelang ihnen, durch dissoziative Extraktion aus aus der KM ein Molekül herauszulösen, welches mehrere biologisch aktive Untereinheiten enthält. Das kleinste z. Z. bekannte Bruchstück weist ein Molekulargewicht von 17.500 Dalton auf.

In der vorliegenden Arbeit soll eine in der Chirurgischen Klinik der Universität Tübingen hergestellte Knochenmatrix auf ihre Induktionswirkung getestet werden. Dabei müssen optimale Kulturbedingungen sowohl für die induzierbaren Osteoprogenitorzellen als auch für die durch Induktion erzeugten Chondro- bzw. Osteoblasten vorausgesetzt werden. Ein erster Arbeitsschwerpunkt ist daher in der Einstellung und Erprobung günstiger Kulturbedingungen für diese Zelltypen zu sehen. Die Untersuchung der induktiven Wirkung der KM-Testsubstanz dient auch der Überprüfung vorliegender Ergebnisse, die hauptsächlich von URIST ET AL (1970 - 79) stammen, sowie der Identifikation wesentlicher Einflußgrößen. Die Erklärung des Induktionsvorganges, über den bisher keine gesicherten Erkenntnisse vorliegen, sowie die Analyse von Aufbau und Struktur der induzierenden Substanz in der KM ist dagegen nicht Ziel dieser Arbeit.

Eine genaue Kenntnis des Differenzierungsverlaufs und der Bedingungen für das induzierte Knochenwachstum kann auch für die medizinische Praxis Bedeutung erlangen. So stellen REDDI UND ANDERSON (1976) fest, daß die Reihenfolge der Ergebnisse und der zeitliche Ablauf während der induzierten Knochenformation in vitro im Prinzip dem Prozeß entsprechen, der während einer Frakturheilung auftritt. In Anbetracht dessen ist anzunehmen, daß die

Knochenmatrix noch eine wichtige Rolle spielen wird für Heilungsprozesse beim Menschen. Die Entwicklung von Knochen mit funktionierendem Knochenmark in der Abdominalmuskulatur von Ratten (z. B. REDDI UND ANDERSON 1976) läßt auch an die Möglichkeit denken, bei Patienten mit Anämie dekalzifizierte KM in Weichteile zu implantieren, um eine neue Quelle aktiver Hämatopoese zu schaffen (URIST 1965).

ALLGEMEINER TEIL

2. KULTIVIERUNG UND IDENTIFIZIERUNG VON MUSKEL- BZW. MESENCHYMZELLEN UND KNOCHENZELLEN

Um die Induktionswirkung einer KM-Substanz untersuchen zu können, ist als Voraussetzung und zu Vergleichszwecken zunächst die Kultivierbarkeit der induzierbaren Zellen (Mesenchymzellen) und der erwarteten Induktionsergebnisse (Knochenzellen) zu gewährleisten. Dazu sind spezielle Kulturtechniken notwendig, wozu in diesem Kapitel ein Literaturüberblick gegeben wird. Zuerst werden in Kap. 2.1 die allgemeinen Grundlagen der Zellkulturtechnik in einem historischen Abriß betrachtet. Dann wird in Kap. 2.2 als Grundlage zu den untersuchten Zelltypen und deren Beziehung zueinander die Genese von Muskel- und Knochenzellen in vivo beschrieben. Auf die Struktur und die Eigenschaften dieser Zellarten sowie auf ihre Kultivierungsmöglichkeiten wird schließlich in Kap. 2.3 und 2.4 eingegangen. Außerdem werden in Kap. 2.5 Verfahren zur Identifizierung dieser Zelltypen behandelt.

2.1 Historische Übersicht zur Entwicklung der Zellkulturverfahren

Bis 1907 war ungeklärt, ob frisch entnommenes tierisches Gewebe, das durch Aufbewahren in warmer Salzlösung oder Ascitesflüssigkeit am Leben erhalten werden konnte, echtes Weiterleben von gesundem Gewebe oder lediglich verzögerten Zelltod zeigte (PAUL 1980). 1907 bewies Harrison eine eindeutige Fortsetzung normaler Zellfunktion in vitro, indem es ihm gelang, Gewebestücke aus der Mark-Gefäßgegend von Froschembryonen in Lymphflüssigkeit als Nährmedium

auswachsende Axone nachzuweisen (HARRISON 1907, NACH PAUL 1980). Da dieses Experiment eindeutig eine normale Zellfunktion in vitro bewies und auch eine reproduzierbare Technik beschrieb, wird das Jahr 1907 als Beginn der Zell- und Gewebekultur angesehen (PAUL 1980).

Die zu Beginn gebräuchlichen Medien waren oft unzureichend und es galt daher, die Faktoren zu erforschen, die für das Weiterleben und Wachsen der Zellen notwendig sind. Das Medium hat die Aufgabe, die physikalischen Verhältnisse wie pH und osmotischen Druck zu schaffen sowie benötigte chemische Substanzen wie Aminosäuren, Kohlehydrate und Vitamine zur Verfügung zu stellen. Natürliche Medien wie Lymph- und Plasmagerinnsel, Fruchtwasser, Ascites, Serum, Gewebeextrakte etc. haben den Nachteil, daß ihre Zusammensetzung unbekannt und variabel ist. Es ist daher unmöglich, Bedingungen exakt zu reproduzieren, so daß man heute den standardisierten synthetischen Medien wie Eagle's, Hank's, CMRL etc. den Vorzug gibt. Eine exakte Einstellung des Mediums ist insbesondere für differenzierte Zellen und die Analyse von Differenzierungsvorgängen von Bedeutung. Diese Zellen sind aufgrund ihrer spezifischen Funktion im Organismus auch an spezifische Umgebungsbedingungen gebunden. Das rasche Verschwinden gewisser Differenzierungseigenschaften bei bestimmten hochdifferenzierten Zellen in Kulturen kann daher auf Ursachen im Medium zurückgeführt werden, wobei die Änderung eines einzigen Bestandteiles Erfolg oder Mißerfolg bedeuten kann.

Zur Herstellung einer bestimmten Zellkultur muß der spezielle Zelltyp aus dem entsprechenden Gewebe isoliert werden. Das wird erreicht durch die Zerstörung des Zellverbandes. Geeignet sind hierzu Trennverfahren wie mechanische Zerlegung und enzymatische Andauung. Das weitere Schicksal dieser Zellen ist unterschiedlich, viele sterben schnell ab und verschwinden

aus der Zellkultur, z. B. die Blutzellen. Andere überleben einige Wochen, ohne sich zu teilen oder beginnen, sich schnell zu teilen und setzen dies über eine geringe Zeit fort, bis sie dann nach einigen Wochen oder Monaten sterben, z. B. die Fibroblasten oder Nervenzellen. Normalerweise teilen sich die Zellen im Kulturgefäß nur bis sie eine maximale Dichte erreicht haben. Dann hören sie auf zu wachsen, auch wenn das Kulturmedium noch nicht erschöpft ist. Diese Eigenschaft wird Kontakthemmung genannt. Um eine weitere Vermehrung der Zellen zu erreichen, müssen sie subkultiviert (passagiert, umgesetzt) werden. Dies erreicht man, indem man die Zellen durch enzymatische Behandlung in Suspension bringt und mit frischem Kulturmedium in geringerer Zahl wieder aussät. Allerdings ist für ein zufriedenstellendes Wachstum die Aussaat einer Mindestzellzahl Bedingung. Wahrscheinlich brauchen die Zellen fürs Überleben wichtige intermediäre Stoffwechselprodukte, was eine Mindestzelldichte erfordert. Die Zellkulturen, welche die beschriebene Verhaltensweise zeigen, werden Primärkulturen und die Entwicklungsreihe Primärzellinie genannt.

Im Unterschied zu den Primärzellinien, die nach einer gewissen Zeit sterben, gibt es Zellinien, welche die Fähigkeit besitzen, in vitro fast unbegrenzt weiterzuwachsen, sog. etablierte Zellinien. Sie sind durch Mutation entstanden (spontan oder durch äussere Einflüsse, z. B. durch Beimpfen mit Tumorviren oder Röntgenbestrahlung) und weichen in vielen Eigenschaften ab von den Primärzellinien. Ihr Verhalten weist, unabhängig von ihrer Herkunft, bemerkenswerte Ähnlichkeiten auf. So geht z. B. der Effekt der Kontakthemmung verloren, die transformierten Zellen wachsen bis zu einer größeren Dichte und in Schichten übereinander.

Wird eine durch enzymalische Andauung gewonnene Zellsuspension genügend verdünnt und in Kulturgefäße ausgesät, so können sich aus einzelnen Zellen Kolonien entwickeln. Dieses Züchten einer solchen Zellinie, die aus einer einzigen Zelle hervorgeht, wird Zellklonierung genannt. Für viele Experimente, z. B. um Zellarten zu bestimmten, ist eine reine Zellinie von Vorteil.

In dieser Arbeit wird auf die Kultivierung zweier Zellarten, der Mesenchymzellen und der Knochenzellen, eingegangen, wobei die Knochenzellen bedeutend anspruchsvoller sind als die Mesenchymzellen und alle Forderungen einer hochdifferenzierten Zelle stellen. Um den Zusammenhang dieser beiden Zellarten aufzuzeigen, wird zuerst auf die Entwicklungsgeschichte im Organismus eingegangen.

2.2 Genese der Muskel- und Knochenzellen

Während der Embryonalentwicklung eines Organismus kann man drei Keimblätter mit drei verschiedenen Zellanlagen unterscheiden, wobei hier nur das dritte Keimblatt, das Mesoderm sowie die Zwischenschicht, welche den Raum zwischen den Keimblättern ausfüllt und durch Auswanderung unzusammenhängender amöboider Zellen aus dem Mesoderm entstanden ist, das Mesenchym, interessiert. Aus dem Material der Keimblätter bilden sich die einzelnen Organanlagen heraus, an denen sich dann die histologischen Differenzierungen abspielen (KÜHN 1964, HADORN 1970).

Aus dem Mesenchym entstammen:

1) Die Muskelsegmente, die sich dann in Skelet-, Darm- und Herzmuskulatur gliedern.

2) Die Bindegewebe, die von der einfachsten Form, dem Gallertgewebe der einfachstorganisierten Tierstämme über Knorpelgewebe bis zu dem nur bei den Wirbeltieren zu findenden Knochengewebe reichen.

3) Die Blutgefäße, Blut- und Lymphzellen.

4) Die Nieren, Samen- und Eileiter
(VOGEL und ANGERMANN 1968).

In der Literatur werden die mesenchymalen Zellen, deren Differenzierung erst im Laufe der Embryonalentwicklung festgelegt bzw. erkennbar wird, mit den verschiedensten Namben bezeichnet. Mesenchymzellen, amoeboid mesenchymal cells, spindle cells, stem cells, fibroblasts, responding fibroblasts, reticulum cells. Die Entwicklung von Myoblasten, Chondroblasten und Osteoblasten aus einem Pool undifferenzierter mesenchymaler Zellen, d. h. pluripotenter Stammzellen sowie Umwandlungen zwischen diesen Zelltypen konnte in zahlreichen experimentellen Untersuchungen in vivo und in vitro mit ausgewachsenem und embryonalem Gewebe nachgewiesen werden (HALL 1970, NATHANSON + HAY 1980). Schon PRITCHARD et al (1956) beobachteten, daß Osteozyten, Osteoblasten, Osteoklasten, Chondroblasten, Reticulumzellen und "spindle cells" eine intertransformable Sequenz bilden. TONNA (1962) konnte auch feststellen, daß sich Osteoblasten zurück in Reticulumzellen verwandeln. BASSET (1962) und URIST (1963) beobachteten, daß embryonales Muskelgewebe sich in Zellen mit osteogenetischem Einschlag (Osteoprogenitor cells) differenzieren. BASSET und HERMANN (1961) konnten zeigen, daß Knochen-, Knorpel- und fibröses Bindegewebe von den gleichen Stamm-Fibroblasten gebildet werden können.

Diese Beobachtungen der Entwicklungsmöglichkeiten von undifferenzierten Zellen zu weiter ausdifferenzierten spezialisierten Zellen wurden von NATHANSON UND HAY (1980) zu erklären versucht, indem sie folgende zwei Hypothesen aufstellten:

1) Die Mesenchymzellen der embryonalen Körpergliedmaßenanlagen (Somiten, limb mesenchym) sind Zellen, welche schon festgelegt sind, entweder für einen myogenen oder einen chondrogenen Weg. Nach dieser Hypothese existieren also verschiedene Typen von Mesenchymzellen, die trotz ihrer relativen Undifferenziertheit bereits die Anlagen für die weitere Entwicklung enthalten. Eine Identifikation dieser vermuteten Zelltypen ist jedoch schwierig und konnte bisher nicht erreicht werden, da diese kein spezifisches Produkt synthetisieren.

2) Jede Mesenchymzelle ist ausgestattet mit einem Potential für eine limitierte Zahl von alternativen Zellprogrammen. Die Entwicklung beispielsweise zum Skeletmuskel, Bindegewebe oder Knochen ist dann abhängig von der Lokalisation der Zelle während der Entwicklung der Gliedmaßen. Die Mesenchymzellen sind demnach phänotypisch unstabil und stabilisieren sich erst nach der definitiven Stellung in myogener oder chondrogener Umgebung.

Früher wurde angenommen, daß eine ausdifferenzierte Zelle die Fähigkeit zur Anpassung an eine andere morphologische Form gänzlich verloren hat. Wurde beobachtet, daß eine Zelle in differenziertem Gewebe ihre Gestalt änderte, so wurde sie als eine noch nicht voll differenzierte angesehen, die noch embryonalen Charakter besaß und sich einer veränderten Mikroumgebung anpaßte (HALL 1970). Diese Annahme

scheint widerlegt durch die schon erwähnten Beobachtungen von TONNA (1962) sowie die von REDDI und HUGGINS (1972). Sie wiesen nach, daß Fibroblasten lange nachdem die embryonale Differenzierung aufgehört hat, die Eigenschaft der Transformierung, d. h. der Umwandlung von einer Zellart in eine andere unter Änderung des sichtbaren und biochemischen Charakters, für ihr ganzes Leben beibehalten können. Diese Beobachtungen führten zu folgenden Fragestellungen:

1) Wie ist es möglich, daß eine schon differenzierte Zelle fähig ist, in ein undifferenzierteres Stadium zurückzukehren und sich dann eventuell zu einem anderen morphologischen Typ zu entwickeln?

2) Ist es für differenzierte Zellen notwendig, eine allgemeine Morphologie, d. h. den Charakter pluripotenter Zellen anzunehmen, bevor sie sich in einen anderen Phänotyp entwickeln oder können sie ihre Differenzierung so steuern, daß sie sich ohne diesen Schritt direkt in einen anderen differenzierten Phänotyp umwandeln können?

Diese Fragestellungen werden in der vorliegenden Arbeit am Beispiel der Beziehungen von Muskel- und Knochenzellen untersucht. Beide Zellarten entstammen - wie aufgezeigt - genetisch demselben noch relativ undifferenzierten Zelltyp, den Mesenchymzellen, wobei die Muskelzellen den Mesenchymzellen bedeutend näher sind als die hochdifferenzierten Knochenzellen. Durch äußere Beeinflussung, z. B. durch Beifügen einer induktiven Substanz wie demineralisierte Knochenmatrix, kann eine Zelländerung hervorgerufen werden. Mittels der Zellkulturen sollen die möglichen Übergänge zwischen Muskel- und Knochenzellen untersucht werden. Die eventuell notwendige Zwischenstufe einer Rückbildung zu Mesenchymzellen wird dabei bewußt

durch eine entsprechende Kulturtechnik aus den Muskelzellen erzeugt.

2.3 Struktur des Muskelgewebes und Kultivierung der Muskelzellen

Das Muskelgewebe, dessen Strukturen bei der Kultivierung bewußt zerstört werden, besteht aus verschiedenen Zelltypen. Durch entsprechende Kulturtechniken gibt es nun zwei Möglichkeiten der Entwicklung, entweder eine Rückbildung einer der Zellarten, der Myoblasten, zu Mesenchymzellen oder eine Regeneration zu funktionierendem Muskelgewebe. Diese Entwicklungsmöglichkeiten sollen im folgenden Kapitel unter Berücksichtigung der Struktur des betrachteten Muskelgewebes, hier des Skeletmuskels, und der Eigenschaften der verschiedenen Zelltypen sowie ihres Verhaltens in Kultur beschrieben werden.

2.3.1 Struktur des embryonalen Skeletmuskels in situ

Der Skeletmuskel besteht aus den Myotuben, die die Myofibrillen enthalten und den eigentlichen Muskelzellen, den einzelligen Myoblasten, die von einem leer scheinenden Extracellularraum umgeben sind, welcher Fibroblasten, Nerven und unreife Gefäße enthält. Die Morphologie unterscheidet sich vom erwachsenen Muskel dadurch, daß die Myotuben beim erwachsenen Muskel durch Bindegwebe verbunden sind, während sie beim embryonalen Muskel von vielen mononnuklealen Myoblasten und wenigen Fibroblasten umgeben sind.

2.3.2 Struktur der explantierten Muskelfragmente und ihr Verhalten in Kultur

Die Muskelfragmente sind nach der Explantation kontraktiert; eine Organisation der Myotuben, die degenerieren und z. T. nekrotisch sind, besteht nicht mehr. Durch die Kontraktion sind die Myoblasten konzentrierter als im intakten Muskel; Fibroblasten werden nur ganz wenige gefunden. Das Gewebe besteht hauptsächlich aus den Myoblasten und den wenigen Fibroblasten, die beide keine Anzeichen einer Degeneration oder eines Zelltodes aufweisen. Die rundlichen Myoblasten enthalten viele freie Ribosomen, wenig ER und wenig Golgiemente, der heterochromatische Kern nimmt einen relativ großen Platz ein. Die schlanken Fibroblasten haben viel ER und einen gut entwickelten Golgiapparat, der abgeflachte euchromatische Kern ist klein zugunsten des Cytoplasmaanteils (NATHANSON UND HAY, 1980).

Je nach Kultivierungsmethode der Muskelfragmente, die sich in der Isolierung der Zellen, im Medium oder im Substrat unterscheidet, gibt es zwei Möglichkeiten der weiteren Entwicklung:

1) Entwicklung zu Mesenchymzellen

URIST ET AL (1970, 1975), NAKAGAWA ET AL (1977) u. a. kultivierten die von den neugeborenen Ratten gewonnenen Muskelstücke auf nicht biologischem Substrat wie Glas oder Plastik. Die anwachsenden Zellen werden von allen Autoren (NOGAMI UND URIST 1970, NAKAGAMA UND URIST 1977, BASSET 1962, ANASTASSIADES ET AL 1978) ähnlich beschrieben: Schlanke, amöboide, spindelförmige, fibroblastenähnliche einkernige Zellen ohne besondere morpho-

logische Kriterien, es sind Mesenchymzellen. Ihre Merkmale entsprechen weder den Myoblasten noch den Fibroblasten. Was geschieht jedoch mit den anderen Elementen der Muskelfragmente? Die Myokuben atrophieren, die Myoblasten bilden kernige Aggregate oder degenerieren zu pyknotischen Fragmenten (NOGAMI UND URIST 1970). Während URIST ET AL (1975) und NAKAGAWA UND URIST (1977) meinen, daß die Mesenchymzellen aus dem bindegewebigen Anteil des Muskels stammen, konnte NATHANSON ET AL (1978) durch Klonierung nachweisen, daß beide Zelltypen, die Fibroblasten und Myoblasten, durch die vorgegebenen Bedingungen in der Zellkultur wieder mesenchymale Strukturen annehmen können. Die Differenzierung der Myo- und Fibroblasten aus den Muskeln der fötalen und neugeborenen Ratten ist offenbar noch nicht stabilisiert, so daß die Zellen in den nicht so idealen in vitro Verhältnissen wieder ihre weniger anspruchsvolle Ursprungsform annehmen.

2) Regeneration zu Muskelgewebe

NATHANSON UND HAY (1980), die Muskeln von 19 Tage alten fötalen Ratten verwendeten, beobachteten die Entwicklung des Muskelgewebes unter anderen Bedingungen, indem sie ein biologisches Substrat, nämlich Kollagengel, benutzten. Die kultivierten Muskelfragmente zeigten in den ersten beiden Tagen folgende Struktur: Die Myoblasten dominierten. Fibroblasten waren nur wenige zu sehen, die meisten Myotuben degenerierten. Nur wenige, wahrscheinlich diejenigen, die so kurz waren, daß sie bei der mechanischen Bearbeitung nicht zertrennt wurden, wiesen eine intakte Struktur auf. Am 4. Tag wurden vereinzelt mehrkernige Zellen gesehen, die die Struktur von Myotuben annahmen. An den folgenden Tagen konnten immer mehr neugebildete intakte

Myotuben mit ihrem kontraktilen Apparat beobachtet werden und nach 10 Tagen füllte sich das Zytoplasma mit Myofilamenten. Nach 20 Tagen bestand das Gewebe aus vielen Myoblasten, wenigen Fibroblasten und vielen intakten Myotuben. Auch nekrotische Myotuben waren noch vorhanden, jedoch schien das Gewebe gesund zu sein und sich regeneriert zu haben.

Zum gleichen Ergebnis kam YAFFEE (1973), obwohl er ein nicht biologisches Substrat verwendete. Er plattierte die aus neugeborenen Rattenmuskeln gewonnenen Zellen in gewöhnliche Kulturplatten aus, allerdings in ziemlich hoher Zelldichte (1,5 x 10^5 Zellen/cm^2). Er beschreibt, daß es ca. 50 Stunden nach dem Aussäen zu einer Zellfusion kam, welche in einer Formation eines Netzwerkes von schnellwachsenden mehrkernigen Fibrillen resultierte. Nach der Fusion konnte er spontane Kontraktionen der Fibrillen feststellen, die sogar die Loslösung der Zellen von der Platte bewirkten.

2.3.3 Kulturtechniken

Zur Herstellung einer Mesenchymzellkultur wird üblicherweise steril gewonnene Tricepsmuskulatur von neugeborenen (z. B. URIST 1969, ANASTASSIADES 1978) oder fetalen (URIST 1970, TERASHIMA ET AL 1974, MATSUTANI 1980, NATHANSON UND HAY 1980) Ratten verwendet. Für den nächsten Schritt, die Zerkleinerung der Muskelfragmente, werden zwei verschiedene Methoden angewandt:

1) Rein mechanische Zerkleinerung

Während URIST ET AL nur eine grobe Zerlegung der Muskelfragmente vornahmen, zerkleinerten NATHANSON ET AL die Muskelstücke unter dem Dissektions-

mikroskop in möglichst kleine Einheiten. Dabei wird die Struktur der Myotuben zerstört; nur die Fibroblasten und die Myoblasten überleben.

2) Mechanische Zerkleinerung und enzymalische Andauung:

a) AINSWORTH (1977) und ANASTASSIADES (1978) geben die grob zerlegten Muskelfragmente in Nährlösung und warten 7 - 10 Tage bis die mesenchymalen Zellen aussprießen, die dann zusammen mit den noch vorhandenen Muskelstücken trypsiniert werden.

b) AINSWORTH (1977) und JAFFEE (1973) geben die grob zerlegten Muskelfragmente in Trypsin- oder Kollagenaselösung (0,15 - 1 % für 30 - 45 Min.). Die aus dem Zellverband gelösten Zellen werden durch mehrmaliges Zentrifugieren und wieder Aufschütteln mit frischem Medium vom Enzym gereinigt und dann kultiviert.

Als Nährlösungen werden Eagle'S, CMRL, Medium 199 oder ähnliche synthetische Medien verwendet, denen 10 - 15 % fetales Kälber- oder Pferdeserum und 1 % Penicillin/Streptomycin beigefügt werden. Die in die Kulturgefäße ausplattierten Zellen werden bei 37 °C, 5 - 10 % CO_2 und 90 - 95 % Luft inkubiert.

2.4 Struktur von Knochen und Knochenzellen und deren Kultivierung

Wie das Muskelgewebe besteht auch das Knochengewebe aus verschiedenen Zelltypen, seine Untersuchung bereitet aufgrund seiner ungewöhnlichen Komplexität Schwierigkeiten. Wegen der mineralisierten Matrix und der Heterogenität der Zelltypen ist es nicht einfach, die Interaktionen zwischen den verschiedenen Zelltypen bei den gleichzeitig ablaufenden Vorgängen

von Knochenformation, -umbau und -abbau zu untersuchen (COHN UND WONG 1980). Um zu verstehen, was sich in einer funktionierenden Knochenzellkultur abspielen kann, werden zuerst der Aufbau und die Funktionen des Knochens in vivo erläutert.

2.4.1 Physiologie und Biochemie der Knochenbildung

Der Knochen besteht aus drei wesentlichen Bestandteilen: Den Zellen, dem organischen Stroma (Matrix) und dem Mineral (FLEISCH 1966, PRITCHARD 1976).
Die Knochenzellen, die, wie in 2.2. beschrieben, die gleiche Stammzelle haben wie die Muskelzellen und als speziell modifizierte, hochspezialisierte Bindegewebszellen angesehen werden, synthetisieren die organische Matrix und sind somit für die Knochenbildung verantwortlich. Während sie Matrix sezernieren, werden sie Osteoblasten, im folgenden Stadium, wenn sie in ihrem Produkt, der Knochensubstanz eingebettet sind, werden sie Osteozyten genannt. Das ausgeschiedene Material, welches zuerst formlos ist und sich dann zur faserig-dichten Knochensubstanz entwickelt, wird Osteoid, der Prozeß der Knochenbildung als solcher wird Ossifikation oder Osteogenesis genannt.
Die für den Knochenabbau verantwortlichen Zellen sind die Osteoklasten.

Die Matrix ist aufgebaut aus Fasern (fibröses Stroma, fibrils) und aus Grundsubstanz. Die Fasern bestehen hauptsächlich aus Kollagen, das vor allem mechanische Funktionen hat, dem Knochen elastische Eigenschaften verteilt und das Gerüst zum Aufbau des Minerals bildet. Das Kollagen, ein Protein, das durch die Aminosäuren Glycin, Prolin, Hydroxyprolin und Hydroxylysin charakterisiert ist, wird intracellulär synthetisiert, während die Polymerisation zu Fasern im extracellulären Raum geschieht und dem Einfluß von verschiedenen

Faktoren wie pH, Konzentration bestimmter Ionen, Anwesenheit von Mucopolysacchariden etc. unterliegt. Die Grundsubstanz, die eine wichtige Rolle spielt beim Transport von Wasser, Ionen und Metaboliten zwischen Gefäßen und Zellen, besteht hauptsächlich aus Mucopolysacchariden, wobei die Chondroitinschwefelsäure eines der wesentlichsten ist. Die Synthese der Grundsubstanz und des Kollagens wird beeinflußt durch Hormone wie Corticosteroide, STH, Calcitonin, Thyroxin und Insulin (FLEISCH 1966, PRITCHARD 1976, BUCHER 1977, WONG ET AL (1978).

Das Mineral setzt sich aus kleinen Kristallen zusammen, die hauptsächlich Kalziumphosphat enthalten. Der Funktionsmechanismus der Verkalkung ist nicht bekannt. Fraglich ist, ob die lebende Zelle über ihre Funktion bei der Matrixbildung hinaus auch bei der Regulation der Kalzifikation mitwirkt oder ob diese nur durch extracelluläre Vorgänge wie chemische, physikochemische und kristallographische Prozesse gesteuert wird (MÜNZENBERG UND DENNERT 1975, FLEISCH 1966, PRITCHARD 1976). Diese Frage zur Aufgabe der Osteoblasten bei der Mineralisation studierten HARELL und BINDERMANN (1976) mittels Zellkulturen. Auf die Ergebnisse wird in Kap. 2.4.4 eingegangen.

2.4.2 Struktur und Verhalten der einzelnen Zelltypen

Im folgenden werden die einzelnen Knochenzellarten beschrieben, ihre Funktion, Morphologie und Ultrastruktur. Aufgrund dieser Kenntnisse wird die Identifikation der Zellarten in Kultur ermöglicht. Daß es trotzdem zu Unsicherheiten in der Zuordnung kommt, liegt einerseits am Verhalten der Zellen selbst, die als Antwort auf bestimmte Bedingungen ihre Identität ändern und Übergangsformen annehmen, andererseits im Charakter der Zellkultur, da sich die Zellen nie so

verhalten wie im Gewebeverband (s. auch Kap. 2.4.6).

1) Die Osteoblasten

Sie sind die eigentlich knochenbildenden Zellen, die die Matrix synthetisieren (FLEISCH 1966). Dies konnte mittels radioaktivem ^{3}H-Prolin gezeigt werden, das in die mit ER besetzte Gegend der Zelle inkorporiert und dann in die Matrix sezerniert wurde (CAMERON 1976). Makroskopisch stellt sich die Osteoblastenzelle dar als viereckiger, plumper Zelleib mit langen schmalen Fortsätzen. Im EM erkennt man, daß diese selber wieder viele feine Fortsätze haben, mit denen sie die Matrix penetrieren (CAMERON 1976, COHN UND WONG 1979). Der Zellkern wird als zentral liegend beschreiben bei COHN und WONG (1979), bei FLEISCH (1966) als exzentrisch.
Die Osteoblasten zeigen die typischen Eigenschaften einer sezernierenden Zelle: Hypertropischer Golgiapparat, viele Mitochondrien, ein gutentwickeltes ER, cytoplasmatische Einschlüsse und Vakuolen (FLEISCH ET AL 1969).

2) Die Osteozyten

Sie gehen aus den Osteoblasten hervor, und besonders die Osteozyten an der Oberfläche des Gewebes sehen ihnen ähnlich, während diejenigen, die tiefer im kalzifizierten Gewebe eingebettet sind, kleiner sind und entsprechend kleinere Organellen aufweisen (CAMERON 1976). Sie haben ein spinnenförmiges Aussehen mit einem plumpen Zelleib und einigen langen feinen zytoplasmatischen Fortsätzen (PRITCHARD 1976). Im EM sieht man, daß die zur Synthese befähigten Organellen wie ER und Golgiapparat reduziert sind und die Kapazität zur

Matrixbildung sicher eingeschränkt ist (CAMERON 1976). Aufgabe der Osteozyten, die in ihrem eigenen Sekretionsprodukt gefangen sind, ist es, den Austausch von Stoffwechselprodukten zwischen Gewebeflüssigkeit und Matrix zu erleichtern sowie die umgebende Knochenmatrix zu resorbieren (PRITCHARD 1976, BINDERMANN ET AL 1974). Die Osteozyten scheinen sich nicht vermehren zu können, ihre Lebenslänge schwankt zwischen Tagen und mehreren Jahrzehnten (CAMERON 1976, PRTICHARD 1976).

3) Die Osteoklasten

Die Osteoklasten sind aggressive Zellen, welche beteiligt sind an der Beseitigung von kalzifizierter Matrix. Komponenten davon konnten in ihrem Zytoplasma gefunden werden (CAMERON 1976). Sie enthalten ein lysosomales Enzym mit saurer Phosphatase, das sie befähigt, Mineral abzubauen (COHN UND WONG 1979). Als spezifische Struktur, die den Resorptionsprozeß ermöglicht, ist ein zu einem Bürstensaum umgewandelter Teil der Plasmamembran im ER zu erkennen. Die Vakuolen einer aktiven Zelle sind gefüllt mit Kristallen und amorphem Material. Von den Knochenzellen haben sie die meisten Mitochondrien, ein Ausdruck einer sehr aktiven Zelle. ER und Golgiapparat sind im Gegensatz zu den sezernierenden Zellen unauffällig (CAMERON 1976, PRITCHARD 1976).

2.4.3 Das Knorpelgewebe

Wie aus der Einleitung hervorgeht, werden die Kulturbedingungen sowie das Verhalten der Mesenchym- und der Knochenzellen untersucht, um entsprechende Identifikationskriterien für die durch die induzie-

rende Substanz (demineralisierte KM) entstehenden Zellen zu erhalten. In diesem Kapitel wird dem Ergebnis etwas vorgegriffen, indem das Produkt der Induktion beschrieben wird, das in der Zellkultur nach bisherigen Ergebnissen aus Knorpelgewebe und -zellen bestand, nicht wie aufgrund der in vivo Versuche erwarteten aus Knochenzellen bzw. Knochengewebe.

Das Knorpelgewebe ist ein dem Knochen sehr ähnliches Gewebe. Wie aus der Darstellung in 2.2 hervorgeht, haben die Osteoblasten und die Chondroblasten das gleiche genetische Potential und sind sich auch sehr ähnlich: Beide haben dieselbe Ultrastruktur und beide synthetisieren Kollagen. Die meisten Autoren (z. B. FELTS 1961, FROST 1964) sind der Ansicht, daß die für die unterschiedliche Entwicklung verantwortlichen Faktoren in der Mikroumgebung liegen, d. h. daß mechanische Faktoren und der Grad der Vaskularisierung die beeinflussenden Größen sind. In Kulturen spielt auch der Sauerstoffgehalt der Begasungsluft eine Rolle. HALL (1970) kam aufgrund von Experimenten mit speziellen Knorpel- bzw. Knochenzellkulturen zu folgenden Ergebnissen:

- Druck und hoher Sauerstoffgehalt (50 - 95 %) führt zu Knochenbildung.
- Zug und niedriger Sauerstoffgehalt (bis 20 %) führt zu Knorpelbildung.
- Zug und hoher Sauerstoffgehalt führt zu Bindegewebsbildung.

In vivo Experimente führten zu ähnlichen Ergebnissen (nach HALL 1970). Es wurde gezeigt, daß Ischämie mechanischer Zug und Sauerstoffmangel die Chondrogenese, dagegen eine adäquate Blutversorgung, mechanischer Druck und genügend Sauerstoff die Osteogenese fördern.

In der Analyse der biochemischen und metabolischen Eigenschaften der Knorpel- und Knochenzellen zeigten sich nur quantitative Unterschiede. So wurden keine Enzyme gefunden, die für die verschiedenen Zellarten typisch (spezifisch) waren. HALL (1970) konnte außerdem zeigen, daß das Auftreten von Chondrogenese oder Osteogenese bzw. die Entwicklung der Stammzellen zum Chondro- oder Osteoblasten nur auf der Syntheserate von bestimmten Enzymen und Enzymprodukten beruht, welche in der Zelle hergestellt werden. Bei den "germinal cells" (Stammzellen) im Knochengewebe, die durch ihre Umgebung zur Entwicklung von Knochenzellen prädestiniert sind, wurde eine höhere Kollagensyntheserate festgestellt als in den "germinal cells" in Knorpelgewebe.
Andererseits wurde in den "germinal" Knorpelzellen mehr Chondroitinsulfat gefunden als in den "germinal" Knochenzellen. Es ist bekannt, daß im Knochen das Kollagen und im Knorpel das Chondroitinsulfat eine entscheidende Rolle spielt. Das Verhältnis von Kollagen zu Chondroitinsulfat könnte wichtig sein für den Differenzierungsvorgang.

2.4.4 Osteogenese in vitro

1) Historische Entwicklung

Die Kultivierung von Knochenzellen begann 1932 mit FELL, der Hühnerknochen mechanisch zerlegte, Periost und Knochenfragmente separat kultivierte und bei beiden zelluläres Wachstum sowie Bildung von mineralisierter Matrix feststellen konnte. Nachher wurde für lange Zeit nur noch Forschungen an Organkulturen mit ganzen Knochen oder Knochenfragmenten durchgeführt und erst 1956 wurde die Zellkulturforschung von FITTON-JACKSON und SMITH wieder aufgenommen (nach COHN UND WONG 1979,

BINDERMANN 1974, HARELL UND BINDERMANN 1976).

FITTON-JACKSON (1957) und PECK (1964) wandten ausser der mechanischen Zertrennung der Knochen erstmals zusätzlich eine enzymatische Andauung mit Trypsin bzw. mit einem Trypsin-Kollagenase-Gemisch an und erreichten eine beinahe vollständige Trennung der Zellen. Die Aufrechterhaltung der Zellkultur bereitete jedoch Probleme, die Lebensdauer der Zellen war nur kurz. Zudem schienen die für die Knochenzellen spezifischen Eigenschaften bei den kultivierten Zellen zu verkümmern. Sie synthetisierten wohl Kollagen, jedoch fand keine Kalzifikation statt. Dies führte zur Annahme, daß die Osteoblasten durch die schneller wachsenden Fibroblasten verdrängt würden und in späteren Stadien eine dominante Fibroblastenkultur vorherrsche (COHN UND WONG 1979, BINDERMANN 1974). Die hochdifferenzierten Knochenzellen, die aus einem komplexen Gewebe isoliert werden, scheinen sehr anspruchsvoll zu sein und können unter den für die weniger differenzierten Zellen (z. B. Fibroblasten) durchaus genügenden Bedingungen weder längere Zeit am Leben erhalten werden noch ihre spezifischen Eigenschaften aufrecht erhalten.

Im folgenden wird näher auf die äußeren Bedingungen eingegangen, die das Wachstum der Knochenzellen beeinflussen können. Wichtigster Faktor scheint die Beschaffenheit des Mediums zu sein. FELL (1932) wandte die "watch-glass" Technik an, bei der die Knochenzellen auf natürlichem Medium, nämlich Plasmagerinnsel mit Embryonalextrakt, wuchsen (nach REYNOLDS 1976, PAUL 1980). Um reproduzierbare Bedingungen zu erhalten, wurden später (z. B. von FITTON-JACKSON 1957) chemisch definierte Medien verwendet, die jedoch zunächst

keine Erfolge brachten. Schließlich fand BIGGERS (1961) ein synthetisches Medium, das den Anforderungen zum größten Teil genügte. Für die Funktion dieses Mediums sind verschiedene zusätzliche Faktoren wie chemische Zusätze, aber auch physikalische Faktoren von Bedeutung. Im folgenden werden daher die bekannten Effekte beschrieben.

a) Zusatz von Ascorbinsäure

Sehr gute Kulturergebnisse brachte eine Version des Biggers'schen Mediums, das Ascorbinsäure enthielt. REYNOLDS (1966) fand, daß bei Knorpelgewebe am 4. Tag in Kultur eine exzessive Hydratation begann, und zwar dann, wenn die gewebseigene Ascorbinsäure aufgebraucht war. Fügte man dem Medium nun Ascorbinsäure zu, verhinderte man die Hydratation, und die Synthese von Kollagen nahm zu. Ascorbinsäure ist ein notwendiger Faktor für die Kollagensynthese und die Ossifikation, da sie ein Co-Faktor der Prolin-Hydrolase ist und erst nach Wirken dieser Hydrolase die Kollagenvorstufen aus der Zelle ausgeschleust werden können (nach STERN und RAISZ 1980).

b) Sauerstoffeffekt

Die vorliegenden Ergebnisse sind zum Teil widersprüchlich und lassen keine Gesetzmäßigkeit erkennen. Neuere Untersuchungen zeigten, daß bei der Wirkung des Sauerstoffs sowohl das Medium selbst als auch insbesondere der Vitamin C-Gehalt des Mediums mitbeeinflussende Faktoren sind (REYNOLDS 1966). Als niedrige Sauerstoffspannungen gelten 5 - 10 % O_2, als mittlere 20 - 35 % und als hohe 95 % O_2. Unter Berücksichtigung der

erwähnten mitbeeinflussenden Faktoren (Medium, Vit. C-Gehalt) weiß man heute, daß hohe Sauerstoffkonzentrationen nicht günstig, vermutlich sogar schädlich sind (Paul 1980). In den Arbeiten von BINDERMANN (1974) und HARELL (1976) wurden gute Ergebnisse mit niedrigem Sauerstoffgehalt, d. h. atmosphärischer Sauerstoffkonzentration erzielt. Auf die Untersuchungen von HALL (1970) bezüglich des Zusammenhangs zwischen Knorpel- bzw. Knochenformation und O_2-Gehalt wurde in Kap. 2.4.3 eingegangen.

c) CO_2-Effekt

Die meisten Kulturen brauchen ein CO_2 gepuffertes Medium. Andere Puffer wie Phosphate sind ungünstig, da sie zu unphysiologischen pH-Werten ansteigen, welche Kulturstudien ausschließen (STERN UND RAISZ 1980). Bezüglich der Knochenresorption und des CO_2-Gehaltes fanden MAHGOUB UND STERN (1974) folgende Beziehung: Die Knochenresorption bei einem Medium mit Albumin als Proteinbestandteil ist bei 5 % CO_2 (Normalbedingung) höher als bei 0,6 % CO_2.

d) Hormone

Eingehend untersucht wurde die Wirkung verschiedener Hormonzusätze auf die Knochenformation und -resorption (z. B. REYNOLDS 1976, WONG ET AL 1977). Die in vivo spezifisch in den Knochenmetabolismus eingreifenden Hormone PTH (Resorption) und Calcitonin bzw. die aktiven Metaboliten des Vitamin D (Formation) können in vitro durch Zugabe ins Medium zur Identifikation einer metabolisch aktiven Knochenzelle dienen (BINDERMANN 1976). Ebenfalls einen Einfluß, wenn auch mit viel geringerer

Wirkung als die oben erwähnten, haben andere Hormone wie Glucocorticoide, Thyroxin, Insulin, Wachstumshormone etc. auf die Knochenformation bzw. -resorption. Ein Vorteil der Kultur ist, daß diese Zusätze einzeln variiert werden können und das Ergebnis nicht wie in vivo durch unbekannte sekundäre hormonelle Antworten von anderen Organen beeinflußt wird (STERN UND RAISZ 1979).

e) Sonstige Faktoren

Die mechanischen Kräfte wie Zug und Druck, die in vivo auf das Knochengewebe einwirken und als entscheidender Stimulus für die Knochenformation oder -resorption angesehen werden, können in vitro nicht annähernd simuliert werden (STERN UND RAISZ 1979). Als ein weiterer entscheidender externer Faktor wird das umgebende Bindegewebe angesehen, das auf das ganze Stoffwechselgeschehen einen Einfluß hat, aber ebenfalls in vitro nicht studiert werden kann. Es wird vermutet, daß proteolytische Enzyme des Bindegewebes das Eindringen bestimmter Stimuli erleichtern bzw. erst ermöglichen und so das Zellwachstum beeinflussen (STERN UND RAISZ 1980).

Unter Berücksichtigung dieser beeinflussenden Faktoren gelang es BINDERMANN 1974 ein Kultursystem einzuführen, in dem Zellwachstum, Differenzierung und Sekretion von Kollagen aufrecht erhalten werden konnte, Kalzifikation stattfand und morphologische und histochemische Merkmale reproduzierbar waren.

2) Bisherige Ergebnisse

BINDERMANN beschrieb die bei den kultivierten Knochenzellen stattfindenden Vorgänge folgendermaßen: In der ersten Phase (bis ca. 7 Tage) entwickelten die kultivierten Zellen ein zusammenhängendes Netz, das charakterisiert ist durch die Berührung der langen Fortsätze, die aus den Zellen ausgewachsen sind und für die Osteoblasten typisch sind. Während der zweiten Phase (2. und 3. Woche) bedeckte die extrazelluläre Matrix, welche das durch die Zelle ausgeschiedene Kollagen enthält, die meisten Zellen. Es war dann nicht mehr möglich, die Zellen von der Matrix abzugrenzen. Die chemische Analyse des von den Zellen ausgeschiedenen Sekretionsproduktes (Kollagen) zeigte die gleiche Zusammensetzung wie die Matrix im lebenden Knochen (BINDERMANN ET AL 1974, HARELL ET AL 1976). In der dritten Phase setzte ein Kalzifikationsprozeß ein. Bündel von verknöchertem Material konnten beobachtet werden, welches den Strukturen von Knochen in vivo glich. Nach acht Wochen konnten im EM Depots von Kalziumphosphatkristallen in der Matrix nachgewiesen werden, die sich zu Inseln von mineralisierter Knochenmatrix zusammenschlossen. Ein weiterer Nachweis der Kalziumphosphatbildung konnte mit der Silbernitratfärbung nach KOSSA erbracht werden. Nach vier Wochen Kultur konnten Depots von Kalziumphosphat festgestellt werden, die sich in Form eines diffusen Netzes oder als kleine schwarze Flecken darstellten. Nach acht Wochen erschien der größte Teil der Kultur schwarz; die Kontrollfärbung bei einem Schädelknochenplättchen zeigte ebenfalls eine schwarze Fläche. Damit gelang es BINDERMANN, die beiden wichtigsten für die Knochenbildung verantwortlichen Funktionen nachzuweisen, nämlich

die Bildung von Kollagen und die daran anschliessende Mineralisation. WILLIAMS ET AL (1980), die unter Anwendung der Methode von BINDERMANN Knochenzellen kultivierten, konnten ebenfalls mineralisierte Knochendepots feststellen, womit die Reproduzierbarkeit nachgewiesen ist.
Zur Beantwortung der in Kap. 2.4.1 aufgeworfenen Frage nach der Beteiligung der Osteoblasten bei der Mineralisation wurde von HARELL UND BINDERMANN (1976) folgender Beitrag geleistet: Sie konnten in einer Zellkultur mit einem durch bestimmte Zusätze (FCS, Hydroxyapatit) speziell eingestellten Medium (BGJ) deutliche Mineralisationseffekte bis zur Einstellung eines stationären Zustandes des intrazellulär und extrazellulär vorliegenden Minerals feststellen. Die Zugabe von Hydroxyapatit stabilisierte dabei die Kalziumphosphatkonzentration in einem reinen mit FCS versetzten Medium ohne Knochenzellen durch Verhinderung von Ausfällungen. Bei Vorliegen von Knochenzellen in der Kultur führte ein hoher FCS-Gehalt (15 %) zu einem schnelleren Zellwachstum, aber auch zu einer Erniedrigung des Kalzium- und Phosphationeninhalts der Knochenzellen. Dieser wurde durch Zugabe von Hydroxyapatit als einer Quelle für Kalzium- und Phosphationen wieder gesteigert. Bei Anwesenheit von Hydroxyapatit akkumulieren die Zellen also viel mehr Kalzium und Phosphat. Das Aufrechterhalten eines stationären Zustandes der Kalzium- und Phosphatkonzentration im Medium und den Zellen bzw. die Existenz einer permanenten Quelle von Kalzium- und Phosphationen in unmittelbarer Umgebung der Zellen scheint aber wesentlich für die Mineralisation der Matrix zu sein. Unklar bleibt, ob die Fähigkeit funktionierender Knochenzellen Mineral zu speichern, ein aktiver und entscheidender Schritt im Prozeß der Kalzifikation ist.

Im Unterschied zur bisherigen vorherrschenden Meinung, daß die Hauptrolle der Knochenzellen mit der Synthetisierung der Matrix abgeschlossen ist, folgern die Autoren jedoch aus ihren Experimenten, daß die Osteoblasten am Prozeß der Mineralisation teilnehmen und diesen regulieren.

2.4.5 Kulturtechniken

Zur Herstellung einer Knochenzellkultur verwendeten BINDERMANN (1974) und HARELL ET AL (1976) steril gewonnene Calvarien von Rattenembryonen. Periost und Knochen wurden getrennt und zerkleinert, dann zwei Stunden in 0,25 %iger Trypsinlösung bei 37 °C inkubiert. Die aus dem Zellverband gelösten Zellen wurden durch Zentifugation (100 g) gewonnen, in BGJ-Medium (modifiziert nach FITTON-JACKSON), das 10 % fetales Kälberserum enthielt, bei 90 % Luft und 10 % CO_2 8 Wochen bei 37 °C inkubiert. Das Medium wurde alle 3 bis 4 Tage erneuert.
WILLIAMS ET AL (1980) verwendeten im Unterschied zu BINDERMANN UND HARELL erwachsene Ratten. Sie prüften bei ihren Kulturen verschiedene Medien und kamen zum Ergebnis, daß nur das BGJb/FJ ein Wachstum der Osteoblasten und Osteoklasten erlaubte.

Durch die enzymatische Andauung können die Zellen wohl aus dem Verband gelöst werden, jedoch es bleibt das Problem, die verschiedenen Zelltypen - Osteoblasten, Osteozyten, Osteoklasten, Periostzellen - zu trennen. 1977 gelang COHN UND WONG eine Digestionstechnik mit einem Kollagenase-Trypsin-Gemisch, das die Trennung der beiden Zellarten Osteoblasten und Osteoklasten erlaubte, die in Kultur die entsprechenden charakteristischen metabolischen Eigenschaften aufwiesen und auf hormonale Stimulantien reagierten wie Gewebe in vivo.

Das Prinzip der Technik besteht darin, daß die von 2 - 3 Tage alten Mäusen gewonnenen Calvarien in einem bestimmten Kollagenase-Trypsin-Gemisch unter den üblichen Bedingungen (95 % Luft, 5 % CO_2, 37 °C) inkubiert werden. Die freigewordenen Zellen werden durch Zentrifugieren gewonnen und in Kulturgefäßen mit BGJb/FJ inkubiert. Dieselbe Prozedur wird mit denselben, schon behandelten Knochenstücken noch fünfmal wiederholt, so daß sechs verschiedene Zellpopulationen daraus resultieren. Aufgrund der charakteristischen biochemischen Merkmale können die ersten zwei Zellpopulationen als Osteoklasten, die Populationen 4, 5 und 6 als Osteoblasten identifiziert werden, während sich in Population 3 beide Zellarten die Waage halten (COHN UND WONG 1979).

2.4.6 Probleme und Beobachtungen bei der Kultivierung isolierter Knochenzellen

In allen Forschungen mit isolierten Zellen, insbesondere jedoch bei den hochdifferenzierten Knochenzellen, bestehen Unsicherheiten bezüglich des Verhaltens der einzelnen Zellen in Kultur und der Zelle im Zellverband des lebenden Organismus. Die wesentlichen seien wie folgt zusammengefaßt:

- Es ist sehr wahrscheinlich, daß die isolierten Zellen durch andere Zellarten kontaminiert sind, bei Osteoblastenkulturen z. B. durch Osteoklasten, Fibroblasten, Blut- und Knochenmarkszellen.

- Während der enzymatischen Behandlung ist es nicht möglich, eine gewisse Zerstörung der Zellen und der Membranstrukturen, evtl. mit der Folge eines veränderten Zellmetabolismus bzw. veränderter Oberflächeneigenschaften (z. B. Hormonrezeptoren) zu vermeiden.

WONG UND COHN (1974) stellten fest, daß die Zellen dabei einen großen Teil ihres Zytoplasmas verlieren, auf hormonelle Angebote kaum reagieren und erst nach 7 Tagen regeneriert sind, wachsen und sich teilen. Es empfiehlt sich daher, bei enzymatisch behandelten Zellen erst nach 7 Tagen mit Experimenten zu beginnen.

- Die Zellen in Kultur können metabolische und morphologische Änderungen erfahren, die reifen Zellen sich entdifferenzieren, die "precursor cells" sich in eine andere Richtung entwickeln, so daß die in Kultur überlebenden Zellen nicht mehr die charakteristischen Eigenschaften haben wie in situ.

- Die morphologische Identifikation von isolierten Zellen ist nicht befriedigend. Die Gestalt in Kultur läßt sich kaum vergleichen mit der Zelle in ihrem natürlichen Bezugssystem (nach COHN UND WONG 1979).

2.5 Vergleich von Mesenchymzellen und Knochenzellen

Nachdem nun die beiden Zellarten isoliert betrachtet wurden, wird im folgenden Kapitel versucht, die von BINDERMANN ET AL. (1974, 1976) erarbeiteten Kriterien zur Identifikation der jeweiligen Zellart aufzustellen.

1) Wachstumsverhalten, Zelldichte, Verdoppelungszeit

   Abb. 1 zeigt die von BINDERMANN (1974) erstellte Wachstumskurve, in der die Zellzahl pro Platte über der Zeit (Tage) in Kultur aufgezeichnet wurde.

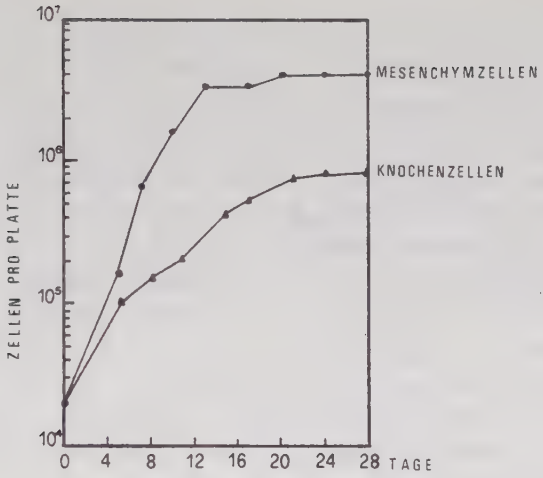


Abb. 1: Wachstumskurve von Mesenchymzellen und Knochenzellen. (BINDERMANN 1974)

Aus den Wachstumskurven ist ersichtlich, daß sich die Knochenzellen unter gleichen Bedingungen deutlich langsamer vermehren als die Mesenchymzellen. Die Zellverdoppelungszeit, d. h. die Zeit zur Verdoppelung der Zellzahl (s. PAUL 1980) der Knochenzellen, ist mindestens zweimal so groß wie bei den Mesenchymzellen. Die Zellproliferationsrate und die Zelldichte in der stationären Phase der Knochenzellen ist viel geringer als bei den Mesenchymzellen.

	Knochenzellen	Mesenchymzellen
Zelldichte	$3{,}0 \times 10^4$ Z/cm^2	4×10^6 Z/cm^2
Verdoppelungszeit	4 Tage	1 Tag

2) Morphologie

Die Morphologie von Mesenchym- und Knochenzellen wurde bereits in Kap. 2.3.2 bzw. 2.4.2 beschrieben. Während die einzelnen Mesenchymzellen immer gut voneinander abgrenzbar und erkennbar sind, sind die Knochenzellen ca. ab der 2. Woche in Kultur von extracellulärer Matrix bedeckt, so daß eine Abgrenzung der einzelnen Zellen unmöglich ist. Nach 8 Wochen können in der Regel bei den Knochenzellen im EM Depots von Kalziumphosphatkristallen nachgewiesen werden. Bei den Mesenchymzellen kommt es weder zu Matrixausscheidung noch zu einer Kristallbildung.

3) Histochemie

Mit der Silbernitratfärbung nach KOSSA kann Kalziumphosphat nachgewiesen werden. In der Knochenzellkultur kommt es nach 4 Wochen zu einer netzartigen bzw. fleckenförmigen, nach 8 Wochen zu einer flächenhaften Schwarzfärbung. Bei den Mesenchymzellen sind über die ganze Kulturdauer nur vereinzelt kleine schwarze Flecken erkennbar.

Mit der Gomori-Kobalt-Färbemethode stellen sich die Orte mit alkalischer Phosphatase schwarz dar. Die Knochenzellen zeigen eine schwarze Rahmenstruktur, es scheint, daß sie an der Zelloberfläche alkalische Phosphatase enthalten. Bei den Mesenchymzellen kommt es zu keiner Schwarzfärbung.

4) Calcitonin-Effekt

Die Ca-Inkorporation ist in den Knochenzellen

4 mal größer als in den Mesenchymzellen unter den gleichen Bedingungen. Bei Verwendung von ^{45}Ca kann dieser Effekt zum Nachweis von Knochenzellen genutzt werden. Verstärkt wird der Effekt noch durch Zugabe des Hormons Calcitonin, das folglich als Marker zur Identifizierung einer metabolisch aktiven Knochenzelle verwendet werden kann. Calcitonin hat bei den Mesenchymzellen keinen Effekt.

3. CHONDROGENESE IN MESENCHYMZELLKULTUREN UNTER DEM EINFLUSS DEMINERALISIERTER KNOCHENMATRIX

URIST beobachtete (1965, 69, 70 etc.) nach Zugabe eines aus Knochenmaterial gewonnenen Substrates in eine Zellkultur von Mesenchymzellen, welche aus Muskelzellen hervorgingen, die Transformation dieser Mesenchymzellen in Chondroblasten, die Knorpelgewebe bildeten. Das benutzte Substrat war demineralisierte Knochenmatrix (KM), die durch Abtrennung anorganischer Bestandteile aus dem Knochen entsteht. Die Vorgehensweise bei der Gewinnung dieser Substanz und der gegenwärtige Wissenstand über ihre Induktionswirkung auf Mesenchymzellen werden wie folgt im einzelnen betrachtet.

3.1 Herstellung und Bedeutung der Knochenmatrix

Zur Herstellung von demineralisierter KM legte URIST lange Röhrenknochen (z. B. von Ratten) in verdünnte Salzsäure (0,6 N HCl bei 2 ^{o}C für ca. 5 Tage) ein, wodurch die anorganischen Bestandteile ausgeschwemmt werden. Zurück bleibt die aus Kollagen und nichtkollagenhaltigem Protein bestehende Matrix (URIST 1973). Aufgrund der Ergebnisse von URIST kann angenommen werden, daß dieses Produkt, das als Bone Morphogenetic Gelatine (BMG) oder Osteogenin Containing Gelatine (OCG) bezeichnet wird, biologisch aktiv ist. Als induktiv wirksame Substanz wird ein Anteil eines Proteins oder eines Polypeptids vermutet, das an Kollagen gebunden ist. Genauere Kenntnisse über diese als Bone Morphogenetic Protein (BMP) bezeichnete, bisher nicht identifizierte Substanz liegen noch nicht vor. Die Annahme, daß das BMP an das Kollagen gebunden ist, beruht auf der experimentellen Erfahrung, daß die

induktiven Eigenschaften durch Zerstörung dieser Verbindung aufgehoben wurden. Die Abspaltung des BMP vom Kollagen wurde experimentell durch Beigabe von neutraler Proteinase bewirkt. Auch die Wirkungsweise des BMP konnte bisher nicht geklärt werden. Es könnte eine Zelltransformation in einer Zellpopulation bewirken, ähnlich wie bei einer Virusinfektion. Es könnte allerdings auch nur membrangebunden sein und dann ähnlich wie ein Hormon wirken, oder aber es dringt in die Zelle oder sogar in den Zellkern der Targetzelle ein. Da die Chondro- bzw. Osteogenese primär durch einen inneren genetischen Mechanismus determiniert ist, müssen die Einflüsse des BMP wohl auf das Knorpel-Knochen-Allel wirken, denn der durch die Induktion erworbene Genotyp ist stabil und wird von Generation zu Generation erhalten (URIST 1973).

3.2 Methoden zur Anwendung der Knochenmatrix

Die ersten Versuchsanordnungen in vitro beruhen auf der Annahme, daß zur Induktion ein direkter Kontakt zwischen den Mesenchymzellen und der KM vorhanden sein muß. Um dies zu erreichen, wurden die Muskelstücke auf Plasmaclots in 1 - 2 cm lange Halbzylinder von demineralisierte Röhrenknochen gesetzt, deren Oberfläche durch Risse und Spalten vergrößert wurde, in Kulturschalen mit Medium und 10 % Serum gegeben und bei 20 % O_2, 5 % CO_2, 75 % Luft bei 37 ^{o}C inkubiert. Die ersten Tage wurden Medien wie z. B. Eagles, CMRL, Medium 199, die ein Auswachsen und eine Proliferation von Mesenchymzellen begünstigen, verwendet, dann wurde auf das für die Differenzierung und Knorpelbildung geeignete BGJ-Medium umgestellt (URIST 1969, NOGAMI UND URIST 1970, TERASHIMA UND URIST (1974). Diese Methode wurde von

AINSWORTH ET AL (1977), der sie neben anderen Verfahren verwendete, als Boat-System bezeichnet.

Versuche ohne direkten Kontakt der Zellen mit der Knochenmatrix zeigten jedoch dieselben Erfolge, so daß angenommen werden kann, daß das in der KM enthaltene BMP ins Medium diffundiert und so die induzierbaren Zellen erreicht. NAKAGAWA UND URIST (1977) benutzten die in Abb. 2 dargestellte Methode. Sie trennten die Muskelstücke durch eine Zellulose-Acetat-Membran von der KM, die im Unterschied zum obigen Verfahren in Form von Partikeln eingebracht wurde.

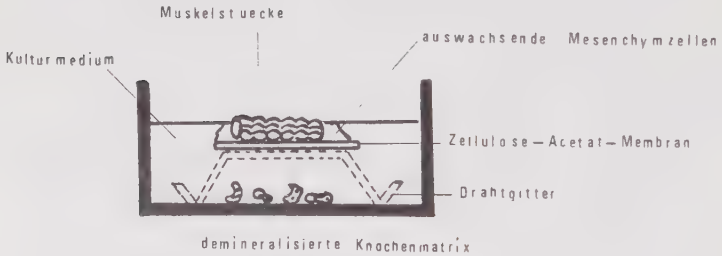


Abb. 2: Kultur der von Muskelstücken auswachsenden Mesenchymzellen, die durch eine Zellulose-Acetat-Membran von der KM getrennt ist. (NAKAGAWA UND URIST 1977)

Anstelle der Muskelfragmente, aus denen erst Zellen auswachsen mußten, verwendete AINSWORTH (1977) reine Zellkulturen von Mesenchymzellen, in die er die KM in Form von Partikeln einbrachte. Bei diesem Verfahren ist unklar, ob jede Zelle mit der Matrix bzw. mit der aus der Matrix gelösten Komponente den gleichen Kontakt hat.

Ideal wäre ein Verfahren, welches das BMP in einen löslichen Zustand bringen könnte. Dies hätte den Vorteil, daß ein gleichmäßigerer Kontakt zwischen den Zellen der Kultur und er induzierenden Substanz hergestellt würde und bei Mediumwechsel eine konstante Konzentration aufrecht erhalten werden könnte. ANASTASSIADES ET AL (1978) glaubte, ein solches Verfahren gefunden zu haben, indem er die demineralisierte KM mit Guanidiumchlorid in einen löslichen Zustand bringen konnte.

Bei den beschriebenen Methoden sind außer den Kontaktformen der Mesenchymzellen mit der KM noch weitere Punkte zu beachten, die z. T. untersucht wurden und z. T. noch Gegenstand weiterer Experimente sein sollten. So beobachtete URIST (1977) in seinen Experimenten, daß die Induktion der Mesenchymzellen in den ersten drei Tagen nach Zugabe der KM stattfindet. Weiter stellte er fest, daß der Induktionseffekt bei jenen Zellen, welche über mehrere Tage kontinuierlich Kontakt mit der KM hatten, größer ist als bei den Zellen, die nur kurzen Kontakt hatten. Ein eindeutiger Beleg für diese Aussage zum Effekt der Zeitdauer des Kontaktes der Zellen mit der KM fehlt jedoch noch. NAKAGAWA UND URIST (1977) stellten fest, daß die KM, die in Partikelform aufbereitet wurde, in einer Mindestmenge (30 - 50 µg/ml) im Kultursystem vorhanden sein muß, um induktiv wirksam zu werden und eine Differenzierung der Mesenchymzellen zu erreichen. Dieser Effekt wird auch von ANASTASSIADES ET AL (1978) angeführt. Als ein weiterer Beleg für diese Konzentrationsabhängigkeit können auch die Ergebnisse der in vivo Versuche von URIST (1973) gewertet werden, die eine Knorpelbildung proportional zur implantierten Menge KM ergaben. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse muß also eine Mindestmenge bzw. -konzentration der

induzierenden Substanz im Medium vorhanden sein. Fraglich ist, ob auch eine optimale Konzentration bzw. eine obere Grenze für die Induktionsfähigkeit existiert. Hat die Substanz, wenn eine solche maximale Konzentration überschritten wird, dann einen inhibitorischen oder gar toxischen Effekt? Zur Beantwortung dieser Fragen wären weitere Versuchsserien durchzuführen.

Weitere zu untersuchende Probleme gibt es auch bzgl. der Kontaktform der KM mit den Zellen. Beim Boat-System und bei der Partikelform hat nicht jede Zelle Kontakt mit der KM. Es wurde zwar nachgewiesen, daß auch Zellen, die nicht direkt mit der KM in Berührung kommen, eine Transformation erfahren. Jedoch stellt sich die Frage, ob es nur eine Zeitfrage ist, bis die aufgelöste induzierende Substanz die weiterentfernten Zellen erreicht hat oder ob es bezüglich der Wirksamkeit Unterschiede gibt.

ANASTIASSIDES (1978) warf schließlich auf Grund von Beobachtungen bei seinen Experimenten die Frage auf, ob der Induktionseffekt der KM vom Alter der Spendertiere abhängt. Eine quantitative Abhängigkeit wurde jedoch nicht angegeben.

3.3 Ergebnisse zur Wirkung der demineralisierte Knochenmatrix

3.3.1 Wirkung in vitro

URIST (1969, 70) und AINSWORTH (1977) machten bei den Boat-System-Versuchen die folgenden Beobachtungen. In den ersten drei Tagen wuchsen aus den Muskelfragmenten amöboide spindelförmige Mesenchymzellen aus. In den folgenden Tagen (6. - 10. Tag) wurden die Zellen in den Räumen und Spalten des

Knochens im Gegensatz zu denen auf anderen Substraten hypertroph und differenzierten sich in der 2. bis 3. Woche zu Chondroblasten, die Matrix ausschieden und Knorpelgewebe bildeten. Nach 3 bis 4 Wochen hatten die Zellen mehr ein osteoblastenähnliches Aussehen, auch die ausgeschiedene Matrix änderte ihren Charakter, jedoch konnte weder Kalzifikation der Knorpelmatrix noch wahre Ossifikation festgestellt werden.

Aufgrund der Beobachtung, daß sich die Zellen im Innern der Muskelstücke zu Fibroblasten, jedoch nicht zu Chondroblasten entwickelten, postulierte URIST zunächst, daß eine chondrogene Induktion nur bei direktem Kontakt der Targetzellen mit der KM möglich ist. Er revidierte jedoch seine Annahme, als er bei Experimenten ohne direkten Kontakt mit der KM beobachtete, daß sich die Mesenchymzellen ebenfalls zu Chondroblasten differenzierten und Matrix ausschieden (URIST 1977). Dieselbe Beobachtung machte AINSWORTH (1977) bei Zugabe von KM in Partikelform in eine Fibroblastenkultur. Es ergab sich ebenfalls eine morphologische Änderung aller Fibroblasten, auch derjenigen, die keinen direkten Kontakt mit der KM hatten. AINSWORTH konnte die induzierten osteoblastenähnlichen Zellen von den Fibroblasten durch Abmessen und Formvergleiche unterscheiden.

NATHANSON UND HAY (1980), die das Boat-System anwendeten, stellten die Umwandlung der Ultrastruktur der aus den Muskelfragmenten auswachsenden Zellen schrittweise dar. Damit konnten sie die unterschiedliche Entwicklung der Zellen auf dem biologisch nicht aktiven Kollagengel, wie sie in Kap. 2.3.2 beschrieben wurde, und auf der biologisch aktiven demineralierten KM aufzeigen. Nach 1 - 2 Tagen Kontakt mit

der KM wurde anstelle der ribosomenreichen Myoblasten, die zunächst in der Zellkultur vorherrschten, das Überwiegen eines anderen Zelltyps festgestellt, nämlich fibroblastenähnlicher Zellen mit viel endoplasmatischem Retikulum und prominentem Golgiapparat. Es ergibt sich die Frage, woher diese Zellen kommen. Wie in Kap. 2.3.2 dargestellt wurde, befinden sich im Muskelgewebe außer den Myoblasten auch Fibroblasten, allerdings in geringer Zahl. Bei Berücksichtigung der Vermehrung dieser wenigen Fibroblasten, gemäß ihrer üblichen Verdopplungszeit, wäre innerhalb von zwei Tagen nur ein Anwachsen auf vier Zellpopulationen erklärbar. Sie könnten daher noch nicht in der Zellkultur überwiegen. Die neuentstandenen fibroblastenähnlichen Zellen müssen folglich zum grössten Teil aus den Myoblasten hervorgegangen sein. Diese haben offensichtlich unter dem Einfluß der KM eine Transformation erfahren. Damit wäre auch eine der in Kap. 2.2 angeführten Fragen für das vorliegende System beantwortet. Offenbar müssen die Muskelzellen zuerst eine allgemeine Form als Stammzellen annehmen, bevor sie in einen anderen Phänotyp übergehen können. Ein direkter Übergang zwischen den Phänotypen Muskelzelle-Knochenzelle scheint nicht möglich zu sein.

Nach 6 Tagen auf KM waren die fibroblastenähnlichen Zellen mit den inzwischen sehr gut entwickelten sekretorischen Organellen (Chondroblastlike cell) von dichtem, amorphem fibrillärem Material umgeben, das sie selbst ausgeschieden haben müssen. Am 6. Tag konnten die ersten Chondroblasten identifiziert werden. Die folgenden Tage waren gekennzeichnet durch weitere Zunahme sowohl der Chondroblasten als auch der mesenchymalen Zellen. Die Matrix

wurde strukturierter und feiner, sie zeigte somit typische Eigenschaften von Chondroblasten. Nach 10 - 20 Tagen dominierten große Chondrozyten mit viel ER und extensivem Golgiapparat, die von gut ausgebildetem Knorpelgewebe umgeben waren. Die meisten Chondroblasten befanden sich in nächster Umgebung der Knochenmatrix, jedoch waren auch in einiger Entfernung fibroblastenähnliche Zellen und Chondroblasten, die nie direkten Kontakt zur KM hatten (NATHANSON UND HAY 1980).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß in den Experimenten z. B. von URIST ET AL., AINSWORTH, NATHANSON UND HAY unter dem Einfluß von dekalzifizierter KM eine Umwandlung eines mesenchymalen in einen chondrogenen Zelltyp mit Knorpelbildung nachgewiesen werden konnte. Jedoch konnten Osteoblasten und Osteogenese in den Kulturen nicht nachgewiesen werden. Es scheint, daß zu dieser Entwicklung die gegebenen Bedingungen nicht genügen. Daß eine durch dekalzifizierte KM induzierte Osteogenese jedoch prinzipiell möglich ist, zeigen die in vivo Versuche, bei denen offensichtlich die notwendigen Bedingungen vorliegen.

3.3.2 Wirkung in vivo

URIST (1965) entdeckte, daß die dekalzifizierte KM, die er in Muskeltaschen der Abdominalmuskulatur von erwachsenen Ratten implantierte, eine Änderung des Gewebes hervorrief. Schon nach einigen Tagen konnte er feststellen, daß sich in der Muskulatur Knorpelgewebe gebildet hatte. Im Gegensatz zu den Zellkulturen wird hier das Knorpelgewebe nach einigen Wochen, sobald Blutkapillaren einsprießen, durch Knochengewebe ersetzt. Die

Knochenzellen konnten durch die Menge der Inkorporation von radioaktivem ^{45}Ca, sowie den Anstieg der alkalischen Phosphatase (beides sind Marker für die metabolisch aktive Knochenzelle) nachgewiesen werden. Die im EM festgestellten Kalziumphosphatkristalle und die histologische Untersuchung bewiesen, daß es sich um Knochengewebe handelt. REDDI (1976) konnte feststellen, daß der Knochenbildung die Differenzierung in funktionierendes Knochenmark mit Erythro- und Granulopoese folgte. Das Vorhandensein und Wachstum der erythropoetischen Strukturen konnte durch die Inkorporation von radioaktivem ^{59}Fe in das proteinbindende Häm nachgewiesen werden.

Da die in vivo Bedingungen viel günstiger sind als diejenigen in vitro, wird die Wirksamkeit der demineralisierte KM oft in vivo in einem Vor- oder Parallel-Versuch nachgewiesen. Daraus wird ersichtlich, ob eine eventuelle Ineffektivität an der Knochenmatrix oder am Zellkultursystem liegt. Auch die durch die KM in Mesenchymzellkulturen transformierten Zellen werden zu Kontrollzwecken in die Muskulatur der erwachsenen Tiere implantiert. Hat die Transformation in Chondroblasten in vitro stattgefunden, so entsteht in vivo Knorpel- und Knochengewebe. Durch diese Implantationsversuche konnte auch gezeigt werden, daß die Myoblasten und Fibroblasten in der Muskulatur von erwachsenen Tieren immer noch die Fähigkeit der Transformierung in eine andere Zellart haben, eine Eigenschaft, die offenbar während des ganzen Lebens beibehalten wird (REDDI 1976).

3.3.3 Wirkung auf andere Zellen mesodermaler Abstammung

Bisher wurden nur die mesodermalen Zellen somatischen Ursprungs betrachtet. NATHANSON (1978) testete die Wirkung von dekalzifizierter KM an Mesenchymzellen visceraler Abstammung, nämlich an Fibroblasten der Kapsel und des Parenchymgewebes von Thyroidea und Lunge. Er stellte fest, daß sich die Zellen der Kapseln beider Gewebe in Knorpelzellen differenzierten, jedoch nicht diejenigen des Parenchyms. Das Resultat zeigt, daß die Möglichkeit der Differenzierung auch bei Fibroblasten visceraler Abstammung besteht.

3.4 Biochemische Nachweismethoden der Chondrogenese

Die Transformation der durch die demineralisierte KM induzierten Zellen wurde bei den Experimenten von NATHANSON UND HAY (1980) und auch bei den meisten Arbeiten von URIST (z. B. 1969, 1970, 1977) anhand morphologischer Kriterien im LM und EM festgestellt. Viele morphologische Umstrukturierungen zu Beginn der Kultur können jedoch auch als unspezifische Antwort auf eine zelluläre Schädigung auftreten (ANASTASSIADES 1978). Es gilt daher, spezifische, biochemische Parameter zu definieren, z. B. Veränderungen der Syntheseprodukte, welche die ersten induktionsbedingten Umstrukturierungen aufzeigen.

3.4.1 Hyaluronsäure und Chondroitinschwefelsäure

Spezifische Sekretionsprodukte der Chondro- und Osteoblasten sind z. B. Hyaluronsäure (HA) und Chondroitinschwefelsäure (CHS), die auch Bestandteile der Matrix sind. HA wird als Ausdruck von Kollagenproduktion gewertet, CHS ist ein knorpel-

spezifisches Mucopolysacchorid (s. Kap. 2.4.1).

Der Nachweis der Chondrogenese in Zellkulturen aufgrund dieser Sekretionsprodukte führte zu unterschiedlichen Resultaten. AINSWORTH ET AL (1977) und URIST (1975) stellten mittels Elektrophorese fest, daß die ins Medium ausgeschiedene Menge an HA während der ersten 72 Stunden bei der Muskelzellkultur nach dem Boat-System (also auf KM) signifikant höher ist als bei einer Kontrollzellkultur auf biologisch nicht aktivem Substrat. Die Menge an CHS dagegen war im Medium der Zellkultur mit der KM nur wenig höher als bei den Kontrollfibroblasten. Der Effekt kann zudem auch auf andere Ursachen zurückgeführt werden, da die Synthese von CHS schon bei geringen Veränderungen von Parametern erhebliche Schwankungen aufweist (AINSWORTH ET AL 1977, REYNOLDS 1976). Demgegenüber schloß AINSWORTH im Fall der HA aus, daß der beträchtliche Anstieg während der ersten 3 Tage Kontakt mit der KM nur durch Beschädigung oder Degeneration der Zellen, z. B. durch einen toxischen Effekt der KM, verursacht werden konnte.

NATHANSON UND HAY (1980), die denselben Versuch wiederholten, stellten in ihren Untersuchungen jedoch fest, daß im Medium beider Kulturen, d. h. bei den auf KM und bei den auf Kollagengel kultivierten Zellen in den ersten drei Tagen dieselben Mengen an HA sowie CHS gefunden wurden. Die Autoren sind der Ansicht, daß die biochemischen Veränderungen in dieser ersten Phase als regenerative Antwort auf die Folgen von Zellschädigung bei der Kultivierung zurückzuführen sind. Sie folgerten aus ihrem Ergebnis, daß die Biosynthese von HA und CHS in dieser Phase (1 - 3 Tage) von der KM unabhängig ist. In

der nächsten Entwicklungsphase (4 - 5 Tage) ist die Synthese von HA und CHS in den Kulturen mit KM allerdings eindeutig höher als in den Kulturen ohne KM. Dies wird auf die transformierten Zellen zurückgeführt, die während dieser Zeit viel ER entwickeln und beginnen, Matrix zu sezernieren und somit ihre Syntheseprodukte ändern. Für die Erfassung der ersten biochemischen Differenzierung während der ersten Phase (1 - 3 Tage) scheint jedoch nach diesen Ergebnissen das produzierte HA und CHS keinen signifikanten Nachweis zu liefern.

3.4.2 Nachweis der Zelldifferenzierung durch Bromodeoxyuiridine (BrdU)-Inhibition

Zelldifferenzierungen können auch dadurch nachgewiesen werden, daß in Parallelversuchen der Differenzierungsvorgang durch spezifische Zusätze verhindert wird. Hierzu kann z. B. das zu Thymidin analoge BrdU dienen. Bei Zugabe von BrdU wird es anstelle von Thymidin in die DNA des prädifferenzierten Genoms eingebaut und hemmt damit irreversibel die Differenzierung. Wird BrdU gleichzeitig mit der KM für zwei Tage dem Medium beigefügt, dann sind die Zellen dieser Kultur zu keiner Differenzierung mehr fähig. Wird es erst zwischen dem 3. und 8. Tag dazugegeben und nachher ausgewaschen, so ist die Hemmung reversibel, es findet eine Differenzierung in Knorpelzellen statt. Hiermit konnte gezeigt werden, daß die Entwicklung zur Knorpeldifferenzierung in den ersten 48 Stunden nach Kontakt mit der KM festgelegt wird. Offensichtlich findet die Transformation des induziblen Faktors der KM ins Plasma der induzierbaren Zelle während dieser Zeit statt (TERASHIMA UND URIST 1974, URIST 1975).

3.4.3 Alkalische Phosphatase-Aktivität

Die alkalische Phosphatase, die bei pH 7-8 ihre optimale Wirksamkeit erreicht, ist ein Enzym, das Phosphormonosäure spaltet. Außer in den Knochen kommt sie in Form von Isoenzymen noch in der Leber, im Dünndarm und in den Nieren vor. Diese Isoenzyme unterscheiden sich z. B. durch Hitzeempfindlichkeit, elektrophoretische Mobilität, Michaeliskonstante etc. (OSDOBY UND CAPLAN 1981, BAKWIN UND BODANSKY 1933, TASWELL UND JEFFERS 1963). Hier interessiert nur die knochenspezifische alkalische Phosphatase, die sich nach BOURNE (1974) in der Plasmamembran der Chondro- und Osteoblasten sowie in den Matrixvesikeln befindet. Sie spielt im Regulationsprozeß der Chondro- und Osteoblasten, in der Bildung der anorganischen Knochensubstanz und im Mineralisationsprozeß eine große Rolle (FLEISCH 1969, KARLSON 1974).

Das Einsetzen von alkalischer Phosphatase-Aktivität in einer Kultur von Mesenchymzellen zeigt daher den Beginn osteogenetischer Prozesse an. Es weist auf eine entsprechende Änderung im Stoffwechselgeschehen der Zellen hin. Nach OSDOBY UND CAPLAN (1981) kann die alkalische Phospatase-Aktivität als ein erster Indikator für diese beginnende Entwicklung eines knorpel- bzw. knochenbildenden Phänotypen angesehen werden. Sie konnten mit diesen Verfahren erstmals zeigen, daß in kultivierten Mesenchymzellen, die von Gliedmaßenanlagen von Kücken (chick limb) stammten, in einem bestimmten Entwicklungsstadium alkalische Phosphatase-Aktivität auftrat. Mit dem Verfahren kann demnach genau bestimmt werden, ob und ab welchem Zeitpunkt die embryonalen Mesenchymzellen sich in Chondro- und Osteoblasten entwickeln.

HANAMURA UND URIST (1978) prüften die Wirkung von osteoinduktiven Sarcomen (DUNN UND RIDGWAY MOUSE OSTEOSARCOMAS) und bestimmten dazu die alkalische Phosphatase-Aktivität von kultivierten Fibroblasten 48 Stunden nach Beigabe der Substanz. Sie konnten einen 4 - 5 mal höheren Gehalt an alkalischer Phospatase-Aktivität feststellen als in den Kontrollfibroblasten. Das Ergebnis bestätigt, daß mit dem Anstieg der alkalischen Phosphatase-Aktivität bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt, in dem die Zellen noch keine eindeutige morphologische Änderung erfahren haben, die Induktion nachgewiesen werden kann.

3.5 Zusammenfassung vorliegender Ergebnisse zum induzierten Knorpel- bzw. Knochenwachstum

Folgende Resultate können festgehalten werden:

- Gibt man zu kultivierten Mesenchymzellen demineralisierte Knochenmatrix, so bewirkt ein in dieser Substanz vorkommender, unbekannter, induzierender Faktor eine Transformation der Mesenchymzellen zu Chondroblasten.
- Gibt man in einem Kultursystem Muskelgewebe auf demineralisierte Knochenmatrix (Boat-System), so findet zuerst eine Umwandlung der bereits differenzierten Myoblasten und Fibroblasten in undifferenzierte mesenchymale Zellen statt, die anschließend einen anderen Differenzierungsweg einschlagen und sich zu Chondroblasten entwickeln.
- In den Mesenchymzellen werden in den ersten Tagen nach Kontakt mit der KM die sekretorischen Organellen entwickelt, jedoch sind diese morphologischen Änderungen noch relativ unspezifisch. Als spezifischer Marker, der die Induktion anzeigt, kann ein Anstieg der alkalischen Phospatase-

Aktivität gewertet werden. In dieser Phase werden die Zellen Chondro- bzw. Osteoprogenitor-Zellen genannt. In den nächsten Tagen erwerben die Zellen die Morphologie von Chondroblasten und sind dann eindeutig identifizierbar. Die anschließende Phase ist charakterisiert durch die Sekretion von typischer Knorpelmatrix.

- Damit überhaupt eine Chondrogenese stattfindet, müssen bei dem Zellkulturverfahren folgende Bedingungen erfüllt sein:

  . Die Targetzellen (Mesenchymzellen somatischer und visceraler Abstammung, Fibroblasten, Myoblasten) müssen noch nicht aktivierte osteogenetische Anlagen haben.
  . Ein extrazelluläres Substrat mit induzierender Wirkung muß in das Kultursystem gebracht werden.
  . Nährmedium und äußere Bedingungen wie Luftfeuchtigkeit, Sauerstoff- und CO_2-Gehalt müssen optimal sein für das Wachstum von Skeletgewebe.

- In vitro differenzieren sich die Mesenchymzellen nur in Chondroblasten und Knorpelgewebe, jedoch nicht in Osteoblasten und Knochengewebe. Wird das in Kultur entstandene Knorpelgewebe zurück in den Spender transplantiert, so verknöchert das Transplantat oder wird resorbiert und durch neue Knochenbildung ersetzt (URIST ET AL 1975, NAKAGAWA UND URIST 1977, HANAMURA UND URIST 1978). Dieses Ergebnis weist darauf hin, daß Knorpel und Knochen dasselbe Genom, jedoch ihrer Umgebung entsprechend verschiedene Phänotypen aufweisen.

EXPERIMENTELLER TEIL

4 METHODE

4.1 Material

a) Zellen: Mesenchymzellen und Osteoblasten

Die Mesenchymzellen wurden aus Femurmuskulatur, die Osteoblasten aus Calvarien von 1 - 3 Tagen alten Wistar-Ratten in Primärkulturen gewonnen.

b) Kulturmedium

Als Kulturmedium wurde für die Mesenchymzellen CMRL, für die Osteoblasten BG.J.b. verwendet. Fötales Kälberserum (FKS), Penicillin/Streptomycyn (P/S) und Glutamin (Glu) wurden jeweils vor Gebrauch aufgetaut und dem Medium zugefügt.

CMRL - 1066 without L-Glutamine	Gibco Europe
BG.J.b. Fitton-Jackson Modification	Gibco Europe
Fötales Kälberserum (FKS)	Seromed
L-Glutamin 200 mM	Seromed
Penicillin/Streptomycin (P/S) 10'000 E/10'000 ng/ml	Seromed
Dimethylsulfoxid (DMSO) $C_2H_6O_6$	Merck

Zusammensetzung des Mediums

- für die Vorbereitung der Primärkultur:
  Medium + 1 % P/S

- für die Ansetzung der Primärkultur:
  Medium + 20 % FKS + 1 % Glu + 1 % P/S

- für die übliche Kultivierung:
  Medium + 10 % FKS + 1 % Glu + 1 % P/S

- für die Wachstumskurven:
  Medium + 10 %, 1 %, 0,1 % und 0 % FKS +
  1 % Glu + 1 % P/S

- Einfriermedium:
  Medium + 20 % FKS + 10 % DMSO + 1 % P/S

c) Trypsin

Das Lösen der Zellen aus dem Gewebe sowie von der Unterlage des Kulturgefäßes erfolgte durch enzymatische Andauung mit Trypsin.

Trypsin (1:250) 2,5 %ig,
in PBS ohne Ca, Mg Seromed

d) Testsubstanz Osteogenin Containing Gelatine (OCG)

Hergestellt von H.P. Fischer in der Chirurgischen Klinik der Universität Tübingen.

e) Chemikalien für Bestimmungen und Färbungen

- für die Vitalfärbung:
  Trypanblau Merck

- für die enzymatische Bestimmung der alkalischen Phosphatase:
  Der fertige Test wurde von der Fa. Merck bezogen. Die Pufferlösung bestehen aus p-Nitrophenylphosphat (26,4 mg).

- für die Proteinbestimmung (nach LOWRY):
  dazu werden drei Lösungen gebraucht, die ebenfalls von der Fa. Merck bezogen werden.
  Lösung A: NaOH 0.3 N
  Lösung B: Kupferreagens 0,1 g $CuSO_4$ x SH_2O in 20 ml 1 % Na-Citrat
  Lösung C: Folinreagens

- für die Färbungen:
  Panoptische Färbung
  May-Grünwalds Eosin-Methylblaulösung und Giemsa Azur Eosin-Methylblaulösung wurden als Fertiglösungen von der Fa. Merck bezogen.

  Osmium Fixierung

Osmium	Merck
Chrom VIoxid	Merck

Die abgewogenen Osmiumkristalle werden in die vorberechneten Flüssigkeitsmengen gegeben, so daß eine 2 %ige OsO_4-Lösung entsteht. Der Lösungsvorgang sollte im Dunkeln ablaufen, da OsO_4 im Licht zersetzt wird.

3) Alkalische Phosphatase-Färbung

Maleinsäure
Trishydromethyl-aminomethan
Aktivkohle
Natriumnaphtylphosphat
Echtblausalz

Die Chemikalien wurden von der Fa. Merck bezogen. Die Lösungen wurden selbst hergestellt.

Herstellung der Trispufferlösung, die für die Inkubationslösung gebraucht wird:
29 g Maleinsäure und 30,3 g Trishydromethylaminomethan
zusammen in 500 ml dest. Wasser lösen, 2 g Aktivkohle dazu, schütteln und anschließend filtrieren.

Herstellung der Inkubationslösung:
20 ml Trispufferlösung, 20 ml dest. Wasser,
40 mg Natriumnaphthylphosphat, 40 mg Echtblausalz (Diazoniumsalz),
Einstellen der Lösung mit NaOH-Plätzchen auf pH 8,5.

f) Geräte

Sterilbank
Brutschrank 37 °C mit CO_2-Regelung
Zentrifuge
Kühlschrank -20 °C
Revco - 70 °C
Leitz-Invertoskop
pH-Meter
Ultraschallgerät
Spektralphotometer
Neubauer Zählkammer

Plastikmaterial:

Falcon Kulturflaschen 200 ml
Falcon Petrischalen 60 x 15 mm und 100 x 20 mm
Falcon Zentrifugentuben 50 ml
Falcon Zentrifugentuben 15 ml

Falcon Gefrierröhrchen 2 ml
Falcon Pipetten 1 ml, 5 ml, 10 ml
Original Perfusor Spritzen 50 ml (Braun)
Einmal Filterhalter 0,45 (Schleicher + Schüll)
Mirkopipetten, Greiner Pipettenspitzen
Pasteurpipetten.

4.2 Verhütung von Kontamination

Um eine Kontamination der Zellkulturen zu vermeiden, muß eine möglichst sterile Arbeitsweise gewährleistet sein. Alle Arbeiten werden in der sterilen Werkbank ausgeführt. Die Arbeitsfläche wird vor Beginn mit 70 %igem Alkohol gereinigt. Die Flaschenhälse und -deckel der Kultur- und Mediumflaschen werden nach dem Öffnen und vor dem Schließen immer sorgfältig abgeflammt. Fertig zubereitete, nicht ganz verbrauchte Nährmedien werden im Kühlraum aufbewahrt und bei erneutem Gebrauch steril filtriert. Für jeden Arbeitsgang werden neue Pipetten verwendet. Beim versehentlichen Berühren der Pipettenspitze mit unsterilen Gegenständen oder den Händen wird die Pipette gewechselt. Die Lösungen sollten nicht mit dem Mund, sondern nur mit dem Gummiball angesaugt werden. Instrumente wie Scheren und Pinzetten wurden im Autoklaven sterilisiert. Um eine Kontamination von seiten des Nährmediums auszuschließen, wird nach jeder Umsetzung eine Probe des reinen Mediums mit angesetzt.

4.3 Anlegen von Primärzellen

4.3.1 Gewinnung von Mesenchymzellen

Als Spendertiere werden 1 - 4 Tage alte Wistar-Ratten verwendet. Die Tiere werden in Äthernarkose getötet und anschließend für 10 - 15 Minuten in

Merfen (farblos) gelegt. Die folgenden Arbeitsgänge werden unter der Sterilbank ausgeführt. Das Sezierbrett wird dabei mit einem sterilen Tuch abgedeckt, wobei das Tuch nach jeder Ratte gewechselt wird. Es müssen genügend sterile Scheren und Pinzetten vorhanden sein. Zur Ablösung der Haut braucht man eine Schere und eine anatomische Pinzette, zur Gewinnung der Muskelstücke eine frische Schere und eine chirurgische Pinzette.

Eine Ratte wird auf dem Sezierbrett aufgespannt, indem man die Füße mit Nadeln fixiert. Die Haut wird am Bauch und an den Oberschenkeln durchtrennt und abgezogen. Mit einer frischen Schere und einer chirurgischen Pinzette wird nun die Muskulatur der Oberschenkel entfernt. Die Muskelstücke werden dann in möglichst feine Stücke geschnitten und in eine Petrischale mit 10ml vorbereitetem Medium gegeben (Medium: CMRL + 1 % P/S).

4.3.2 Gewinnung von Osteoblasten

Es werden dieselben Tiere unter denselben sterilen Bedingungen wie zur Gewinnung der Muskelstücke verwendet. Man schneidet die Haut in der Mitte des Schädels zwischen den Augen beginnend bis zum Nacken auf und zieht sie über die Seiten bis zu den Ohren ab. Mit einer spitzen Schere sticht man in die Furche zwischen den Ossa frontalii und schneidet in der Mitte durch bis zum Os occipidale. Nun wird der Knochen mit einer Pinzette festgehalten und mit der Schere wird der pergamentartig dünne Knochen von der Stirn über die Ohren bis zum Nacken herausgeschnitten. Die Knochenplättchen legt man auf ein steriles Tuch und schabt mit der Pinzette ev. vorhandene Hirnmasse und das Periost weg. Dann werden sie in möglichst kleine Teilchen verschnitten und in eine Petrischale mit 10 ml vorbereitetem Medium

gegeben (Medium: B.G.J.b. Medium + 1 % P/S).

4.3.3 Aufbereitung der Muskel- bzw. Knochenfragmente

Die weitere Behandlung der Muskel- bzw. Knochenstückchen unterscheidet sich nur in der Benutzung verschiedener Medien und wird daher gemeinsam beschrieben.

Man gibt 10 ml (1,25 %iges) Trypsin in die Petrischalen mit den Muskel- bzw. Knochenstückchen und inkubiert sie 30 Minuten bei 37 °C. Dann füllt man die Lösung mit den Gewebefragmenten mit Hilfe einer Pipette und einem Gummibällchen in einen Zentrifugentubus und zentrifugiert 10 Minuten bei 1600 U/Min. Anschließend wird die Trypsinlösung abgesaugt. Um die zelltoxische Trypsinlösung auszuwaschen, gibt man 30 ml Medium (CMRL + 1 % P/S + 20 % FKS bei den Muskeln, BG.J.b. Medium + 1 % P/S + 20 % FKS bei den Knochen) dazu und schüttelt die Gewebestückchen auf. Nochmals wird 10 Min. bei 1600 U/Min. zentrifugiert. Das Medium wird abgesaugt und der Rückstand in 40 ml Medium ((CMRL bzw. BG.J.b. + 1 % P/S + 20 % FKS) resuspendiert, in eine Kulturflasche (KF) gegeben und inkubiert. Pro Kulturflasche nimmt man die Gewebeteilchen von 2 bis 3 Tieren.

4.4 Kultivierung und Subkultivierung der Zellen

a) Kultivierung

Die Zellen wurden in beschichteten Kulturflaschen (200 ml) bei 37 °C, 5 % CO_2 und 95 % Luft in trockener Atmosphäre kultiviert.
Für die Mesenchymzellen wurde als Nährmedium CMRL + 10 % FKS + 1 % Glu + 1 % P/S, für die Osteoblasten BG.J.b. Medium + 10 % FKS + 1 % Glu

+ 1 % P/S, genommen. Zu Versuchszwecken wurden die die Serumskonzentrationen (0 - 10 % FKS) variiert, dazu wurden die Zellen in Petrischalen (60 x 15 mm) kultiviert.

b) Subkultivierung (Passagieren, Umsetzen)

Die Zellen liegen in den Kulturflaschen als Einschicht-Kulturen (Monolayers) vor.
Sie wurden umgesetzt, wenn der Zellrasen so dicht war, daß der ganze Boden der Kulturflasche bedeckt war (3 - 8 x 10^6 Zellen).

Arbeitsanleitung zur Umsetzung einer KF:

- Kulturmedium abschütten.
- 10 ml Medium ohne Zusätze dazugeben.
- 5 ml Trypsin dazugeben
- ca. 10 Min. bei 37 ^{o}C inkubieren, d. h. so lange, bis sich die Zellen vom Boden gelöst haben und in Zellfetzen in der Trypsinlösung schwimmen.
- Zellen durch Ein- und Aussagen mit der Pipette vereinzeln.
- In den Zentrifugentubus geben und bei 1600 U/Min. 10 Min. zentrifugieren.
- Trypsinlösung absaugen, mit reinem Medium aufschütteln und nochmals zentrifugieren.
- Zellen in 10 - 20 ml Nährmedium resuspendieren.
- Zellen auf die jeweiligen Kulturflaschen verteilen (ca. 1,5 - 4 x 10^6 Zellen pro KF) und mit Nährmedium (10 % FKS + 1 % Glu + 1 % P/S) auf 40 ml auffüllen.

4.5 Einfrieren von Zellen

Das Einfrieren erfolgte nach der Salk-Institut-Methode.

- Zellen mit Trypsin aus den KF lösen, zentrifugieren, Trypsin auswaschen und wieder zentrifugieren (s. obige Beschreibung).
- Anschließend Resuspendieren der Zellen in Einfriermedium (20 % FKS + 10 DMSo + 1 % P/S). Die Zellen einer KF werden in 2 Gefrierröhren aufgeteilt.
- Suspension in Gefrierröhren geben und beschriften: Zelltyp, Datum und Zahl der Umsetzungen.
- Tubus für 2 - 4 Stunden in 4 ^{o}C-Kühlschrank stellen.
- Einen Tag bei - 70 ^{o}C tieffrieren.
- Aufbewahren in flüssigem Stickstoff.

4.6 Auftauen von Zellen

- Die gefrorenen Zellen schnell auftauen lassen im 37 ^{o}C-Wasserbad.
- Aufgetaute Zellen in einen Zentrifugentubus geben und mit 10 ml Medium + 10 % FKS verdünnen.
- Für 5 - 10 Minuten bei 1200 U/Min. zentrifugieren und Überstand absaugen.
- Zellen resuspendieren in Medium mit 20 % FKS.
- In Kulturflaschen geben (1 Gefriertube gibt 1 KF) und bis zur ersten Umsetzung in Nährmedium mit 20 % FKS wachsen lassen.

4.7 Vitalfärbung

Die Vitalfärbung mit Trypanblau wird angewendet, um die Zell-Lebensfähigkeit zu bestimmen. Die Membran der lebenden Zelle ist für den Farbstoff

undurchlässig, während tote Zellen die Substanz aufnehmen. Der Zellkern färbt sich dann blau.

Man mischt 10 µl Trypanblau und 50 µl Zellsuspension. In der Zellsuspension darf kein FKS mehr enthalten sein, da Eißweiß eine große Affinität zu Farbstoff hat und deshalb zu Fehlern führen kann. Nach 5 Minuten zählt man die toten angefärbten Zellen und die lebenden, nicht gefärbten Zellen.

Berechnung der Lebensfähigkeit:

$$\text{Lebensfähigkeit \%} = \frac{\text{Gesamtzahl - Zahl der toten Zellen}}{\text{Gesamtzahl}} \times 100\ \%$$

(nach PAUL 1980).

4.8 Zellzahlbestimmung

Man bestimmt die Zellzahl mit Hilfe einer Zählkammer vom Typ Neubauer. Die Zellen werden zunächst, wie oben beschrieben, mit Trypsin aus den KF gelöst, gewaschen und zentrifugiert. Dann werden sie entsprechend ihrer Dichte mit isotoner Kochsalzlösung verdünnt (erfahrungsgemäß mit 10 ml), so daß in der Verdünnung nicht mehr als ungefähr $3 - 8 \times 10^5$ Zellen pro ml vorhanden sind. Um die Zellen, die sich zum Teil verklumpt haben, zu isolieren, pipetiert man sie einige Male auf und ab und überträgt dann sofort einen Tropfen in die Zählkammer (Abb. Nr. 3). Man zählt alle Zellen in jedem der großen Quadrate aus (s. Abb.), bildet das Mittel und multipliziert mit 10.000. Das ergibt die Zellzahl pro ml. Die Zellzahl pro ml mal das Volumen der Verdünnungslösung gibt dann die Zellzahl pro Kulturflasche.

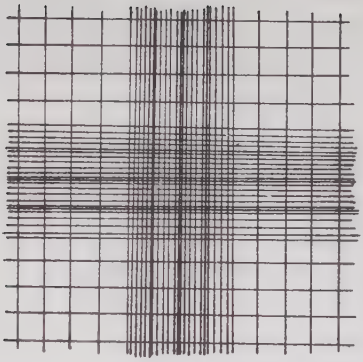


Abb. Nr. 3: Schema der Neubauerkammer

4.9 Enzymatische Bestimmung der alkalischen Phosphatase

Wieder werden die Zellen mit Trypsin gelöst (wie oben beschrieben). Anschließend wird folgendermaßen vorgegangen:

- Um alles Nährmedium auszuwaschen, wird das Pellet 2 mal in physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert und zentrifugiert.
- Die Zellen werden in 1 ml 0,1 mal Phosphatpuffer pH 7-8 resuspendiert und bei 4 ^{o}C aufbewahrt.
- Um die Enzyme frei zu bekommen, werden die Zellen mit Ultraschall zerstört. Man hält das Reagenzglas so, daß der Stab des Ultraschallapparates in die Zellsuspension hineinragt, aber den Boden des Glases nicht berührt. Nun wird der Apparat 3 x 10 sec eingeschaltet, mit dazwischenliegenden Pausen von 10 sec. Anschließend wird as Reagenzglas sofort wieder in Eis gestellt.
- Das Homogenat wird bei 4 ^{o}C mit 4 - 5000 U/Min. 10 Minuten zentrifugiert.

- Unterdessen löst man in 10 ml Puffer eine Substrattablette auf. Puffer: Diäthanolamin pH 9,8, 1 mol/l, Substrat: 4 - Nitrophenolphosphat, 10 mmol/l, Aktivator: $Mg\ Cl_2$.
- Nun wird im Absorptionsphotometer bei Zimmertemperatur und 405 nm die Aktivität des Enzyms bestimmt. Man gibt 2,5 ml Puffer-Substrat-Lösung in eine Küvette und gibt in ca. 2 minütigen Abständen 50 µl Testsubstanz dazu.

Die alkalische Phosphatase katalysiert die Hydrolyse von Phosphorsäureestern.
Prinzip:

$$\text{Nitrophenolphosphat} + H_2O \xrightarrow[\text{Phosph.}]{\text{alk.}} \text{Nitrophenol} + \text{Phosphat}$$

Die Extinktionszunahme pro Minute ist der Menge an freigesetztem Nitrophenol pro Minute und damit der Enzymaktivität proportional.

Berechnung der Enzym-Volumenaktivität:

$$U/ml = \frac{V}{e \cdot d \cdot v} \quad E/min.$$

V = Volumen der Puffer - Substrat - Lösung in der Küvette + Volumen der Testsubstanz

e = 18,5

s = Schichtdicke der Küvette (1 cm)

c = Volumen der Testsubstanz

E = Extinktionsdifferenz.

Mit der Enzym-Volumenaktivität und dem Proteinwert (s. Kap. 4.10) wird die spez. Aktivität berechnet:

$$U/mg = \frac{\text{Volumenaktivität U/ml}}{\text{Proteinwert mg/ml}}$$

4.10 Proteinbestimmung nach Lowry

- Man zentrifugiert die Reagenzgläschen mit der Puffersubstratlösung von Kap. 4.9 und den zerstörten, ev. aufgeschwemmten Zellen 10 Min. bei 4 - 5000 U/Min.
- Dann stellt man 1 ml Proteinlösung her, indem man mit einer Mikropipette die noch vorhandene und nicht mit Zelltrümmern verunreinigte Lösung in ein neues Reagenzglas pipettiert und dann mit dest. Wasser auf 1 ml auffüllt (s. Abb. 4).

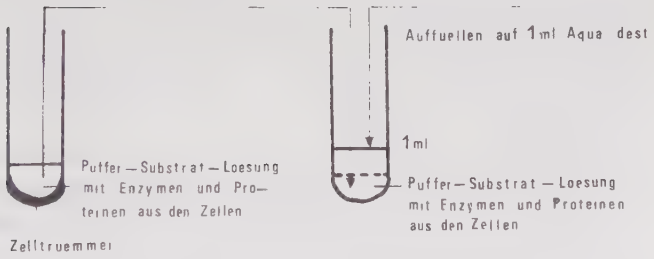


Abb. Nr. 4

- 0,5 ml einer 0,3 n NaOH-Lösung beigeben.
- 90 - 120 Min. bei 60° inkubieren.
- 5 ml Kupferreagens hinzufügen.
- 10 Min. in die Dunkelheit stellen.
- 0,5 ml Folin-Reagens hineingeben.
- 30 Min. in die Dunkelheit stellen.
- Die optische Dichte wird bei 623 nm im Spektralphotometer bestimmt. Zur Festlegung des Leerwerts dient 1 ml H_2O.

Zur Erstellung der Eichkurve wird Rinder-Serum-Albumin in Mengen zwischen 10 und 100 µg eingesetzt.

4.11 Wachstumskurven in Abhängigkeit der Serumkonzentration

Mesenchymzellen und Osteoblasten wurden in 60 x 15 mm Petrischalen mit je 5 ml Medium und 1 % FKS in einer Zelldichte von 1,6 x 10^5 (Mesenchymzellen) und 3 x 10^5 (Osteoblasten) Zellen pro Schale ausplattiert und 24 Stunden inkubiert. Dann wurden alle Schalen mit serumfreiem Medium gewaschen, um eine Addition von Serumresten zu den experimentell verwendeten Serumkonzentrationen auszuschließen. Zur Erfassung der günstigsten Wachstumsbedingungen und zur Beobachtung des Zellverhaltens wurden die Serumkonzentration variiert. In je 20 Schalen wurde Medium gegeben, das 10 %, 1 %, 0,1 % und 0 % FKS enthielt.
Das Wachstum der Kulturen mit den verschiedenen Serumkonzentrationen wurde durch Bestimmung der Zellzahl von je 2 Platten im 24-Stunden-Intervall über 10 Tage festgehalten. Das Nährmedium wurde während des Versuchs nicht mehr erneuert.

4.12 Färbungen

Um Farbpräparate herzustellen, wurden die Zellen in Petrischalen (100 x 200 mm) ausgesät und je nach gewünschter Entwicklungsstufe und Dichte einen halben bis 3 Tage im Brutschrank belassen.

4.12.1 Panoptische Färbung

Bei dieser Färbmethode werden die Zellkerne blauviolett dargestellt. Es wird folgendermaßen

vorgegangen:

- Absaugen des Nährmediums und zweimaliges Nachspülen mit isotoner Kochsalzlösung.
- 1 bis 2 Stunden an der Luft trocknen lassen.
- Fixieren des Präparates durch May-Grünwald-Lösung. Man läßt 20 bis 30 Tropfen 3 Minuten einwirken.
- Zufügen der gleichen Menge dest. Wassers und 1 Minute belassen.
- Abgießen (nicht Abspülen) der verdünnten Farblösung.
- Färben des Präparates durch verdünnte Giemsa-Lösung: 10 Minuten.
  (Verdünnung: 10 Tropfen Lösung auf 10 ml Wasser.)
- Abspülen mit dest. Wasser, trocknen mit Filtrierpapier.

4.12.2 Osmiumfixierung

Mit der Osmiumfixierung wird eine sehr gute Darstellung der Zellstrukturen erreicht. Es wird folgendermaßen vorgegangen:

- Absaugen des Nährmediums und zweimaliges Spülen mit isotoner Kochsalzlösung.
- Auf den Deckel der Petrischale gibt man 3 Tropfen einer 2 %igen OsO_4-Lösung.
- Man schließt die Schale so , daß der Deckel unten liegt und die aufsteigenden Dämpfe auf die am Boden haftenden Zellen einwirken (die Flüssigkeit darf nicht direkt mit den Zellen in Berührung kommen).
- Einwirkungsdauer der Dämpfe 2 - 3 Min.
- Spülen der Zellen mit Leitungswasser.
- Eventuell Kernfärbung mit Hämatoxilin-Eosin.

Im Prinzip ist die Osmiumfixierung geeignet für ein anschließendes elektronenmikroskopisches Untersuchungsverfahren. Durch den Einbau geeigneter Stoffe wie Osmium wird eine Zunahme der Elektronenabsorption und damit ein besserer Bildkontrast erreicht.

4.12.3 Alkalische Phosphatase Färbung
(mit Azokupplungsmethode)

Die Syntheseorte der alkalischen Phosphatase in der Zelle können durch eine Färbemethode nachgewiesen werden, die nachfolgend beschrieben ist.

- Absaugen des Nährmediums, zweimaliges Nachspülen mit isotoner Kochsalzlösung.
- Fixierung durch 3 - 4 stündiges Lufttrocknen.
- Bedecken der Zellen mit Inkubationsflüssigkeit (s. Kap. 4.1.e)) und in den Brutschrank stellen.
- Nach 30 Minuten Lösung in ein Becherglas schütten und Beurteilung der Zellen im Mirkoskop. Wenn die Stellen der Syntheseorte der alk. Phosphatase noch nicht dunkelbraun sind, beläßt man die Schale nochmals 5 - 10 Min. im Brutschrank.
- 3 x sorgfältiges Waschen der Zellen mit Leitungswasser.

Prinzip des Färbevorganges:

Das aus der Inkubationslösung angebotene Phenol (Natriumnaphthylphosphat) wird an ein gleichzeitig gelöstes Diazoniumsalz (Echtblausalz) angelagert, wodurch ein Azofarbstoff entsteht. Das Reaktionsprodukt erscheint dann braun.

4.13 Einsetzen der Testsubstanz OCG

Um die Wirkung der OCG auf Mesenchymzellen zu prüfen, wurden die Zellen einer 4. Passage verwendet, die man 2 Tage in BG.J.b-Medium mit 10 % FKS wachsen ließ. Am 3. Tag nach der Umsetzung wurde Mediumwechsel ausgeführt, wobei man in 4 Kulturflaschen 1 % FKS und in 3 Kulturflaschen 10 % FKS zugab. Gleichzeitig wurden in jede Flasche 10 mg OCG Partikel < 400 µg gegeben. Ebenfalls wurden Probeflaschen mit 1 % und 10 % FKS ohne OCG, und solche ohne Zellen, nur mit OCG und Medium angesetzt. Am nächsten Tag waren etwa dreiviertel der OCG-Partikel fest am Boden der Kulturflaschen mit den Zellen und ein Viertel schwamm im Medium. Das Medium mit den schwimmenden Bestandteilen wurde mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Neues Medium und nochmals je 10 mg BMG wurde beigefügt. In der folgenden Zeit wurde bei den Flaschen mit 10 % FKS jeden Tag, bei denen mit 1 % FKS jeden zweiten Tag das Medium gewechselt, wobei jeweils ein Viertel des alten Mediums belassen wurde. Etwa 60 % der gesamten zugefügten OCG-Partikel hafteten am Boden, d. h. waren in den Zellverband eingewachsen. Am 14. und am 16. Tag hatten sich die Zellen einer Kulturflasche mit 1 % FKS vom Boden gelöst und waren nicht mehr zu gebrauchen. Am 21. Tag nach Zugabe der OCG wurden die Zellen geerntet und enzymatisch die alkalische Phosphatase bestimmt.

5 ERGEBNISSE

5.1 Beobachtungen beim Anlegen von Primärkulturen

5.1.1 Abhängigkeit des Zellwachstumbeginns von der Größe der Gewebestücke am Beispiel von Mesenchymzellen

Um eine Zellsuspension zu erhalten, wird als erstes eine mechanische Gewebe-Dissoziation vorgenommen, indem die Gewebestücke möglichst fein verschnitten werden. Als zweite Dissoziationsmethode wird die enzymatische Andauung mit Trypsin angewendet. Je feiner nun die Gewebestücke mechanisch zertrennt werden, desto größer ist die Angriffsfläche für das Trypsin und desto mehr Zellen werden aus dem Zellverband gelöst, die sich auf dem Boden des Kulturgefäßes festsetzen und teilen können.

Zellwachstum / Größe der Muskelstücke	1. Tag	2. Tag	3. Tag
0,3-0,5 cm^2	keine Zellen	keine Zellen	einzelne Zellen am Boden der KF angehefetet.
0,2-0,3 cm^2	einzelne Zellen am Boden der KF angeheftet.	einzelne Proliferationszentren vorhanden.	Boden der KF teilweise mit Zellen bedeckt.
0,2 cm^2	viele einzelne Zellen am Boden der KF angeheftet.	viele Proliferationszentren vorhanden.	Boden der KF ganz mit Zellen bedeckt. 1. Umsetzung möglich.

Aus den Versuchen ist ersichtlich, daß der Zeitpunkt des Auswanderns der gelösten Mesenchymzellen aus den Gewebestücken und damit der Beginn des Zellwachstums

in Kultur außer von der enzymatischen Andauung auch von der mechanischen Bearbeitung abhängt. Je kleiner die Gewebestücke zertrennt werden, desto früher beginnt das Zellwachstum und desto schneller können die Zellen subkultiviert werden. Diese Beobachtung gilt allerdings nur für den Beginn der Kultur. Nach der ersten Umsetzung besteht kein Unterschied mehr im Wachstumsverhalten.

5.1.2 Abhängigkeit des Zellwachstumbeginns von der Trypsinkonzentration am Beispiel von Mesenchymzellen

Das Trypsin ist das Enzym, das am häufigsten zur Gewebsandauung benutzt wird. Es lag in 2,5 %iger Lösung vor (1:250 in PBS ohne Ca und Mg) und wurde für die Versuche entsprechend verdünnt. Die Muskelgewebestücke ($< 0{,}2\ cm^2$ wurden in den verschiedenen Trypsinkonzentrationen 30 Minuten bei 37 ^{o}C inkubiert. Die besten Ergebnisse wurden mit 1,25 %igem Trypsin erzielt. Schon nach 1 - 2 Tagen konnte hiermit das Auswachsen einzelner Zellen festgestellt werden. Nach der Behandlung mit 0,5 %igem Trypsin war der Erfolg zufriedenstellen; am 7. Tag wuchsen die ersten Zellen aus. Bei der Anwendung von 0,25 %igem Trypsin war die Konzentration offensichtlich zu schwach; erst nach der zweiten Trypsinbehandlung zeigten sich am 11. Tag vereinzelte Zellen.

Trypsin-konzentration / Zellwachstum	0,25 %	0,5 %	1,25 %
1. Tag	kein Wachstum	kein Wachstum	einzelne Zellen am Boden der KF angeheftet
3. Tag	kein Wachstum	kein Wachstum	Boden der KF bedeckt mit Zellen
7. Tag	kein Wachstum	einzelne Zellen am Boden der KF angeheftet	1. Umsetzung
10. Tag	2. Trypsinbehandlung mit Trypsin	Boden der KF bedeckt mit Zellen	2. Umsetzung
11. Tag	einzelne Zellen sichtbar		
13. Tag	Boden der KF bedeckt mit Zellrasen	1. Umsetzung	3. Umsetzung

5.1.3 Unterschiedliches Wachstumsverhalten von Muskel- und Knochenzellen unter gleichen Bedingungen

Bei gleicher Vorbehandlung (Gewebestücke < 0,2 cm^2, 30 Minuten Inkubation bei 37 ^{o}C in 1,25 %iger Trypsinlösung) zeigten die aus Muskel- und Knochenstücken hervorgegangenen Zellen ein unterschiedliches Wachstumsverhalten, das entweder charakteristisch für den jeweiligen Zelltyp sein kann oder aber auf eine unterschiedliche Ansprechbarkeit des Ausgangsgewebes auf die Trypsinbehandlung zurückgeführt werden könnte.

Zelltyp / Zell-wachstum	Mesenchymzellen	Osteoblasten
1. Tag	einzelne Zellen am Boden der KF angehefetet	kein Wachstum
2. Tag	Proliferationszentren sichtbar, Boden der KF teilweise mit Zellen bedeckt	kein Wachstum
3. Tag	Zellrasenüber den ganzen Boden der KF	einzelne Zellen am Boden der KF angeheftet
5. Tag	1. Umsetzung	lockerer Zellverband über Teile des Bodens der KF
8. Tag	2. Umsetzung	lockerer Zellverband über den ganzen Boden der KF
11. Tag	3. Umsetzung	dichter Zellverband
13. Tag	4. Umsetzung	1. Umsetzung

5.2 Beobachtungen bei der Subkultivierung

5.2.1 Anhaften der Zellen

Die nach der Trypsinbehandlung zum größten Teil einzeln vorliegenden kugeligen Zellen haften sich im frischen Medium bereits nach 1 - 2 Stunden mit füßchenähnlichen Fortsätzen an den Boden der Kulturflasche an (Abb. 5). Nach 4 bis 6 Stunden bei den Mesenchymzellen, nach 10 bis 12 Stunden bei den Osteoblasten besitzen die Zellen ihre "spezifische" Form und können sich erneut teilen. Abb. 6 zeigt Osteoblasten 24 Stunden nach der Subkultivierung. Die Zellen befinden sich in einer intensiven Teilungsphase, wobei sich sogenannte Proliferations-

zentren bilden.

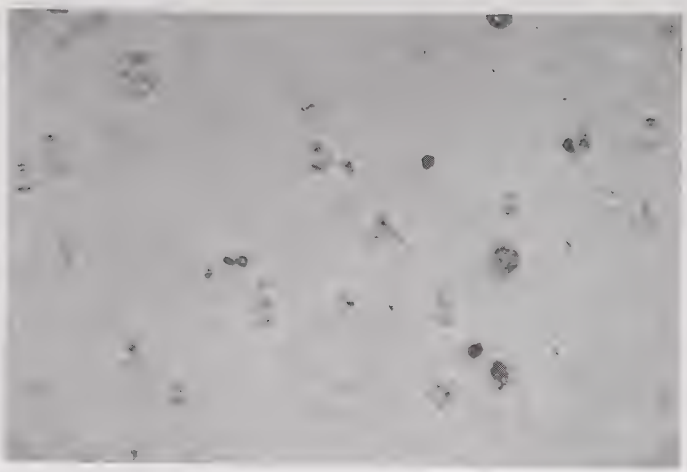


Abb. 5: Trypsinierte Osteoblasten

Abb. 6: Proliferationszentrum von Osteoblasten

5.2.2 Kontakthemmung

Wie auch in der Literatur beschrieben (PAUL 1980, HAYFLICK 1980), konnte unter den vorliegenden Kulturbedingungen festgestellt werden, daß sich die Mesenchymzellen und die Osteoblasten nur vermehren, bis sie eine maximale Dichte erreicht haben. Die Zellen liegen immer nur einschichtig vor (Monolayer). Die maximale Dichte bei den Mesenchymzellen wird nach ca. 3 Tagen erreicht und beträgt ca. 4×10^5 Zellen/ml; bei den Osteoblasten wird sie nach ca. 6 Tagen erreicht und beträgt ca. $1{,}5 \times 10^4$ Zellen/ml. In dieser Dichte lassen sich die einzelnen Zellen kaum mehr erkennen, jedoch unterscheiden sich die Mesenchymzellen und die Osteoblasten in der Struktur der Zellanordung. Während die Mesenchymzellen in fast parallel ausgerichteten Linien angeordnet sind (Abb. 7), zeigen die Osteoblasten unregelmäßige, verwaschene Strukturen. Ist die maximale Dichte erreicht, hören die Zellen auf zu wachsen und sich zu vermehren. Sie teilen sich erst wieder, wenn sie in geringerer Konzentration frisch ausgesät werden. Diese Eigenschaft, die nur bei Primärkulturen auftritt, wird in der Literatur als Kontakthemmung bezeichnet. Wenn die Zellen nicht umgesetzt werden, lösen sie sich vom Boden der KF, sobald das Nährmedium ausgeschöpft ist.

Abb. 7: Fast parallel ausgerichtete Strukturen der Mesenchymzellen

5.2.3 Aussatdichte

Wie aus der folgenden Tabelle ersichtlich ist, vermehren sich die Zellen nur optimal, wenn sie in genügend hoher Konzentration ausgesät werden. Diese Eigenschaft wird ebenfalls in der Literatur beschrieben wird (z. B. PAUL 1980).

Zellwachstum / Einsaatmenge Zellzahl/KF (ml)	Mesenchymzellen	Osteoblasten
$0,5 - 1 \times 10^5$ ($1,25 - 2,5 \times 10^3$/ml)	optimales Wachstum, Umsetzung nach 1 bis 2 Tagen	optimales Wachstum, Umsetzung nach 3 bis 4 Tagen
$1 - 2,5 \times 10^4$ ($2,5 - 6 \times 10^2$/ml)	gutes Wachstum, Umsetzung nach 3 bis 4 Tagen	Wachstum vorhanden, Umsetzung nach 7 bis 10 Tagen
$0,2 - 1 \times 10^4$ ($0,5 - 2,5 \times 10^2$/ml)	langsames Wachstum, Umsetzung nach 6 bis 8 Tagen	vereinzelte Zellen oder Zellgruppen, die sich am Boden der KF anheften, Zellen sterben nach 10 bis 20 Tagen, ohne sich vermehrt zu haben
$10^3 - 10^4$ ($2,5 \times 10^2$/ml)	einzelne Zellgruppen haften am Boden, Bildung von einzelnen Proliferationszentren noch möglich	kein Wachstum

Man sieht, daß die weniger empfindlichen Mesenchymzellen sich noch bei geringer Aussaatdichte vermehren, während die Osteoblasten nur bei einer bestimmten hohen ausgesäten Zellzahl ein Wachstum aufweisen. Aus dem langsamen Wachstumsverhalten bzw. dem langsamen Absterben bei geringer Zelldichte könnte man schließen, daß die Zellen auf eigene Stoff-

wechselprodukte, die nur von einer bestimmten Zellzahl in genügend hoher Konzentration produziert werden können, angewiesen sind (PAUL 1980). Das durch stoffwechseleigene Sekretion bestimmter Faktoren angereicherte Medium nennt man "konditioniertes" Medium.

5.2.4 Lebensfähigkeit nach Trypsinbehandlung

Das Trypsin wird nicht nur zur Gewebedissoziation, sondern auch zum Lösen der Zellen vom Kulturgefäß bei der Subkultivierung verwendet. Wurde dazu 0,5 %iges Trypsin in die KF gegeben und 10 Minuten bei 37 °C inkubiert, so konnte durch Trypanblaufärbung eine Vitalität von 85 - 90 % aller gelösten Zellen nachgewiesen werden (s. Kap. 4.7 Vitalfärbung). Während bei der Gewebedissoziation mit dem 1,25%igen Trypsin die besten Ergebnisse erzielt wurden, ist diese Konzentration für das Lösen der Zellen von der KF offensichtlich zu stark. Die Zellen werden zerstört, sie kleben in langen schleimigen Fäden zusammen. Nach PAUL (1980) könnte ein Teil dieses schleimigen Materials DNS aus den zerstörten Zellen sein.

5.2.5 Maximale Lebenslänge

Eine Primärzellkultur ist nicht unbegrenzt lebensfähig; es besteht eine maximale Lebensdauer. Dies ist nicht einem experimentellen Fehler zuzuschreiben, sondern beruht auf einer angeborenen Eigenschaft der Zellen (HAYFLICK 1980). Die Teilungsfähigkeit menschlicher Fibroblasten z. B. ist auf etwa 50 Verdoppelungen der Zellzahl beschränkt.

Bei den Mesenchymzellen gelang es im Rahmen der vorliegenden Arbeit, eine Serie über 182 Tage am Leben zu erhalten. Die Zellen wurden anfangs in 2 - 3tägigen, später in 3 - 4täigen Abständen umgesetzt, insgesamt 57 mal. Gegen Ende vermehrten sich die Zellen immer langsamer, dann begannen sie sich in großen Fetzen von der Unterlage zu lösen, was Zelltod bedeutet. Bei den Osteoblasten betrug die höchste Lebensdauer 105 Tage, die Zellen wurden insgesamt 21 mal umgesetzt. Anfänglich konnten sie in Abständen von 4 - 5 Tagen subkultiviert werden, dann wurden die zeitlichen Abstände immer größer, da die anfängliche Dichte nicht mehr erreicht wurde. Die Zellen hörten schließlich auf, sich zu teilen und verkümmerten.

5.3 Entwicklung der Zellkulturen ohne Subkultivierung

5.3.1 Mesenchymzellen

Nach der 3., 5., 10., 14. und 17. Umsetzung wurde ein Teil der Zellen nicht mehr weiter subkultiviert, es wurde nur täglich das Nährmedium erneuert. Jeweils nach 10 Tagen wurden die Zellen geerntet und ausgezählt. Es konnte beobachtet werden, daß das Verhalten der Zellen ohne Subkultivierung von ihrem Alter abhängt. Bis etwa zur 12. Umsetzung wird eine Zellzahl bis 8×10^6 Z/KF erreicht; im LM zeigen sich die in Abb. 3 beschriebenen parallel ausgerichteten Strukturen der Zellen. Bei den Zellen die nach der 12. Umsetzung nicht mehr weiter subkultiviert werden, nimmt die Zellzahl erheblich höhere Werte an. Im LM können keine regelmäßigen Strukturen mehr festgestellt werden, es scheint, als ob die Zellen in Schichten übereinander wachsen. Aus diesen Beobachtungen und den Zellzahlbestimmungen kann geschlossen werden, daß die Kontakthemmung, wie sie

in der Literatur als Eigenschaft der Primärkulturen beschrieben wird, nur bei jungen Zellen auftritt, während die älteren Zellen diese Eigenschaften offenbar verloren haben. Eine Zellkernuntersuchung müßte zeigen, ob die Zellen eine Transformation, z. B. eine Änderung der Chromosomenzahl, erfahren haben.

Zahl der Umsetzungen	Alter der Zellen	Zellzahl nach 10 Tagen ohne Subkultivierung
M_3	14 Tage	8×10^6 Z/KF
M_5	21 Tage	8×10^6 Z/KF
M_{10}	38 Tage	2×10^7 Z/KF
M_{14}	50 Tage	8×10^7 Z/KF
M_{17}	58 Tage	9×10^7 Z/KF

5.3.2 Osteoblasten

Die Osteoblasten, die nicht subkultiviert wurden, zeigten ein von den Mesenchymzellen abweichendes Verhalten. Die Zellzahl blieb auch bei den älteren, nicht subkultivierten Zellen konstant bzw. nahm sogar etwas ab. Es scheint folglich, daß bei den Osteoblasten die Eigenschaft der Kontakthemmung nicht verloren geht.

Zahl der Umsetzungen	Zahl der Zellen	Zellzahl nach 10 Tagen ohne Subkultivierung
O_3	21 Tage	3 x 10^6 Z/KF
O_5	30 Tage	3,5 x 10^6 Z/KF
O_{10}	51 Tage	2,5 x 10^6 Z/KF
O_{13}	62 Tage	3 x 10^6 Z/KF
O_{15}	73 Tage	2 x 10^6 Z/KF

5.3.3 Bildung von Knochengewebe aus nicht subkultivierten Osteoblasten 2 % CO_2

Die in der Literatur (z. B. BINDERMANN 1974, HARELL et al 1976) beschriebene Entwicklung der Knochenzellen zu kalzifiziertem Knochengewebe konnte unter den üblichen Bedingungen (5 % CO_2, 37 °C), soweit im LM beurteilbar, nicht nachvollzogen werden. Bei einem zufälligen Absinken der CO_2-Konzentration im Brutschrank auf 2 % zeigten die Osteoblasten jedoch ein verändertes Verhalten. Dabei konnte die folgende Entwicklung beobachtet werden. Die Osteoblasten bildeten zunächst keinen so dichten Zellrasen wie unter den üblichen Bedingungen und wurden daher nicht umgesetzt. Nach ca. 6 Tagen schienen sie sich nicht weiter zu vermehren und behielten über die folgenden Tage eine konstante Zelldichte. Abb. 8 zeigt die Osteoblasten 6 Tage nach der letzten Umsetzung. Die einzelnen, sich nur in einem losen Verband befindenden Zellen sind deutlich zu erkennen.

Abb. 8: Osteoblasten 6 Tage nach Umsetzung

Nach 12 Tagen habensich im Zytoplasma um die Zellkerne herum Granulationen gebildet, was in Abb. 9 zu erkennen ist.

Abb. 9: Osteoblasten (12 Tage): beginnende Granulation

Abb. 10 zeigt die Osteoblasten nach 20 Tagen. Auffallend sind die Zellkerne mit den umgebenden Granulationen, jedoch sind die einzelnen Zellen kaum mehr zu erkennen. Die Zellgrenzen werden verwischt durch eine feine Matrix, die offenbar von den Osteoblasten ausgeschieden wurde.

Abb. 10: Osteoblasten (20 Tage) mit Matrix und Granula

Die nächste Abbildung (11) stellt zum selben Zeitpunkt (nach 20 Tagen) einen etwas größeren Ausschnitt der Kultur dar und zeigt in einer Übersicht die bisher abgelaufenen Entwicklungsschritte: die einzelnen Osteoblasten, die Verwischung der Zellen durch die ausgeschiedene Matrix und die beginnende Umstrukturierung der Matrix (links unten im Bild).

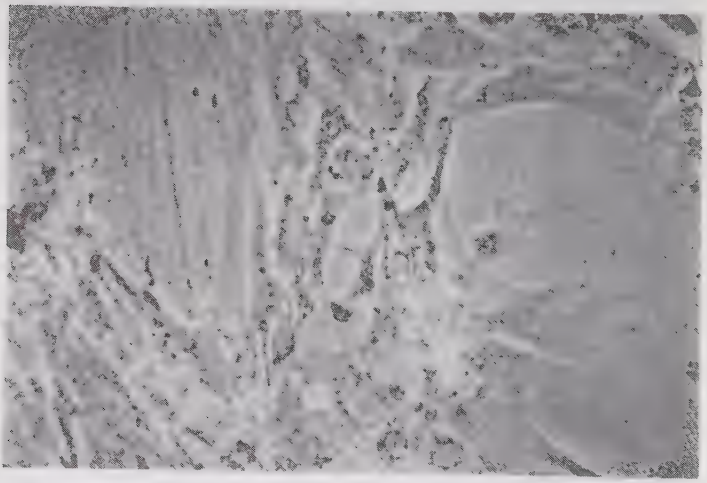


Abb. 11: Osteoblasten (20 Tage). Beginnende Umstrukturierung der Matrix

Nach 30 Tagen zeichnen sich in der Matrix weitere Veränderungen ab in Form von entstandenem amorphem umstrukturiertem Gewebe. Es sind keine einzelnen Zellen mehr erkennbar (Abb. 12).

Abb. 12: Osteoblasten (30 Tage). Osteoidartiges Gewebe

In der folgenen Zeit fanden in der Matrix Mineralisationsprozesse statt. Das Gewebe stellt sich als Knochenplatte dar (Abb. 13).

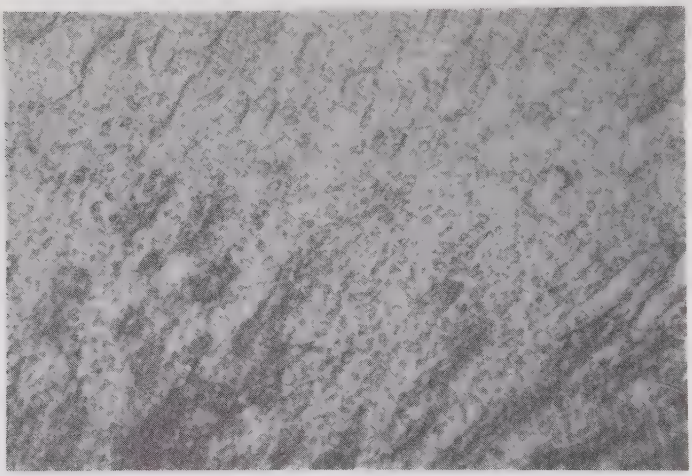


Abb. 13: Osteoblasten (51 Tage). Knochengewebe

In diesen 51 Tagen konnte eine Entwicklung von den einzelnen Knochenzellen bis zum zusammenhängenden Knochengewebe verfolgt werden. Ob wirklich der erniedrigte CO_2-Gehalt oder aber andere, nicht bekannte Faktoren entscheidend waren für die Auslösung dieser Entwicklung kann nicht abschließend beurteilt werden.

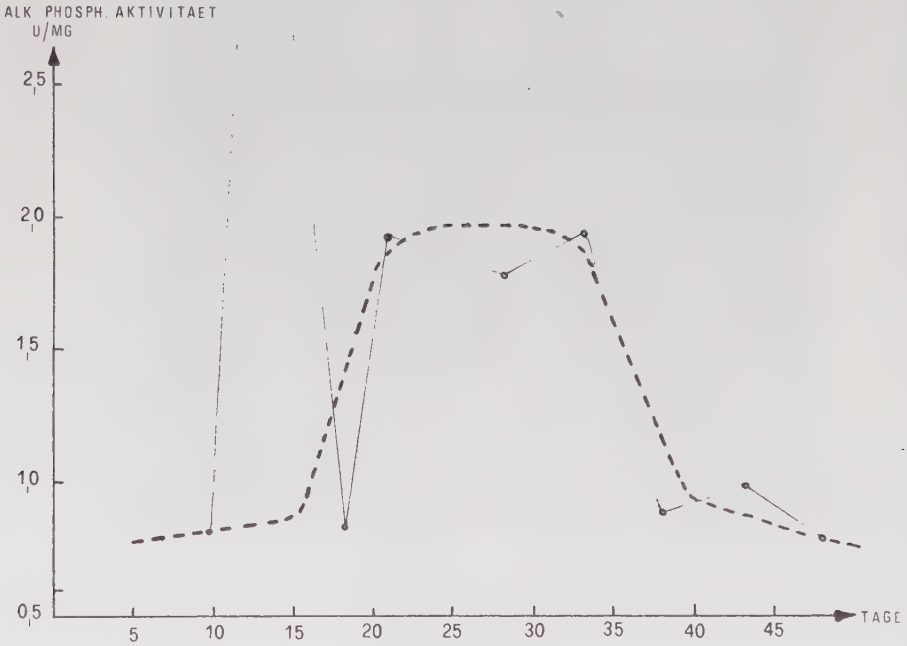
5.4 Alkalische Phosphatase-Aktivität von Mesenchymzellen und Osteoblasten

Es ist bekannt, daß es ein knochenspezifisches Enzym gibt, die alkalische Phosphatase, das auch in den Chondro- und Osteoblasten vorkommt und im Regulationsprozeß dieser Zellen eine Rolle spielt

(OSSDOBY UND CAPLAN 1981, BOURNE 1974, s. Kap. 3.4.3). In der vorliegenden Untersuchung wurde der Gehalt an alkalischer Phosphatase in den Mesenchymzellen und in den Osteoblasten bestimmt. Bei den Mesenchymzellen war nur eine Spur alkalischer Phosphatase-Aktivität feststellbar. Aus drei Proben ergab sich ein Mittelwert von 0,012 U/mg. Die Osteoblasten zeigten dagegen eine deutliche Phosphatase-Aktivität. In der folgenden Tabelle ist die alkalische Phosphatase-Aktivität von 10 Osteoblastenkulturen bestimmt worden. Nach jeder Umsetzung wurde eine Probe bestimmt, um einen möglichen Zusammenhang zwischen alkalischer Phosphatase-Aktivität und Alter der Zellen festzustellen.

Zahl der Umsetzungen Alter der Zellen		U/ml	Proteingehalt mg/ml	spez. Aktivität U/mg
O_1	10 Tage	0,0938	0,106	0,852
O_2	14 Tage	0,284	0,08	0,55
O_3	18 Tage	0,133	0,16	0,832
O_4	23 Tage	0,197	0,103	0,912
O_5	26 Tage	-	-	-
O_6	30 Tage	0,203	0,113	0,796
O_7	35 Tage	0,188	0,096	1,958
O_8	40 Tage	0,089	0,100	0,89
O_9	46 Tage	0,158	0,157	1,006
O_{10}	51 Tage	0,107	0,135	0,792

Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung auch graphisch dargestellt:



Graphische Darstellung der alkalischen Phosphatase-Aktivität von Osteoblasten verschiedenen Alters

Wird der zweite Wert, der wahrscheinlich auf einen Meßfehler zurückzuführen ist, nicht berücksichtigt, so ist aus der Darstellung ersichtlich, daß die höchste alkalische Phosphatase-Aktivität der Osteoblasten zwischen 20 und 40 Tagen liegt. Die relativ niedrige Aktivität der ersten Tage könnte auf eine Schädigung der Zellen zurückzuführen sein, die durch die traumatische Gewebsdissoziation entstanden ist. Die Zelle braucht eine gewisse Erholungszeit, um ihre spezifischen Funktionen wieder voll aufnehmen

zu können. Die Abnahme der Aktivität nach 40 Tagen kann mit einer vorzeitigen Alterung der Zellen erklärt werden, ausgelöst durch die Kulturbedingungen, die den in vivo Bedingungen nie gleichkommen. Möglich wäre auch ein Verlust der spezifischen Funktionen der Osteoblasten bzw. eine Rückentwicklung zu einem weniger anspruchsvollen Zelltypen, verursacht durch die ungenügenden Kulturverhältnisse.

5.5 Wachstum der Zellen in Abhängigkeit verschiedener Serumkonzentrationen

Mesenchymzellen und Osteoblasten wurden mit einer Ausgangszellzahl von $1{,}6 \times 10^5$ bzw. 3×10^5 Zellen pro Kulturschale ausplattiert. Mit einer Serumsausgangskonzentration von 1 % (24 Std. Inkubation bei 37 ^{o}C) wurde erreicht, daß die Zellen sich an die Unterlage anheften, jedoch noch nicht zu aktiver Proliferation angeregt werden. Durch tägliche Zellzahlbestimmung wurde das Wachstum der Zellen über 10 Tage verfolgt. Die Abb. 14 und 15 zeigen das Wachstumverhalten von Mesenchymzellen und Osteoblasten für verschiedene Serumkonzentrationen (10 %, 1 %, 0,1 %, 0 %). Die Zellzahl ist angegeben als Zellzahl pro Platte (60 x 15 mm Petrischale).

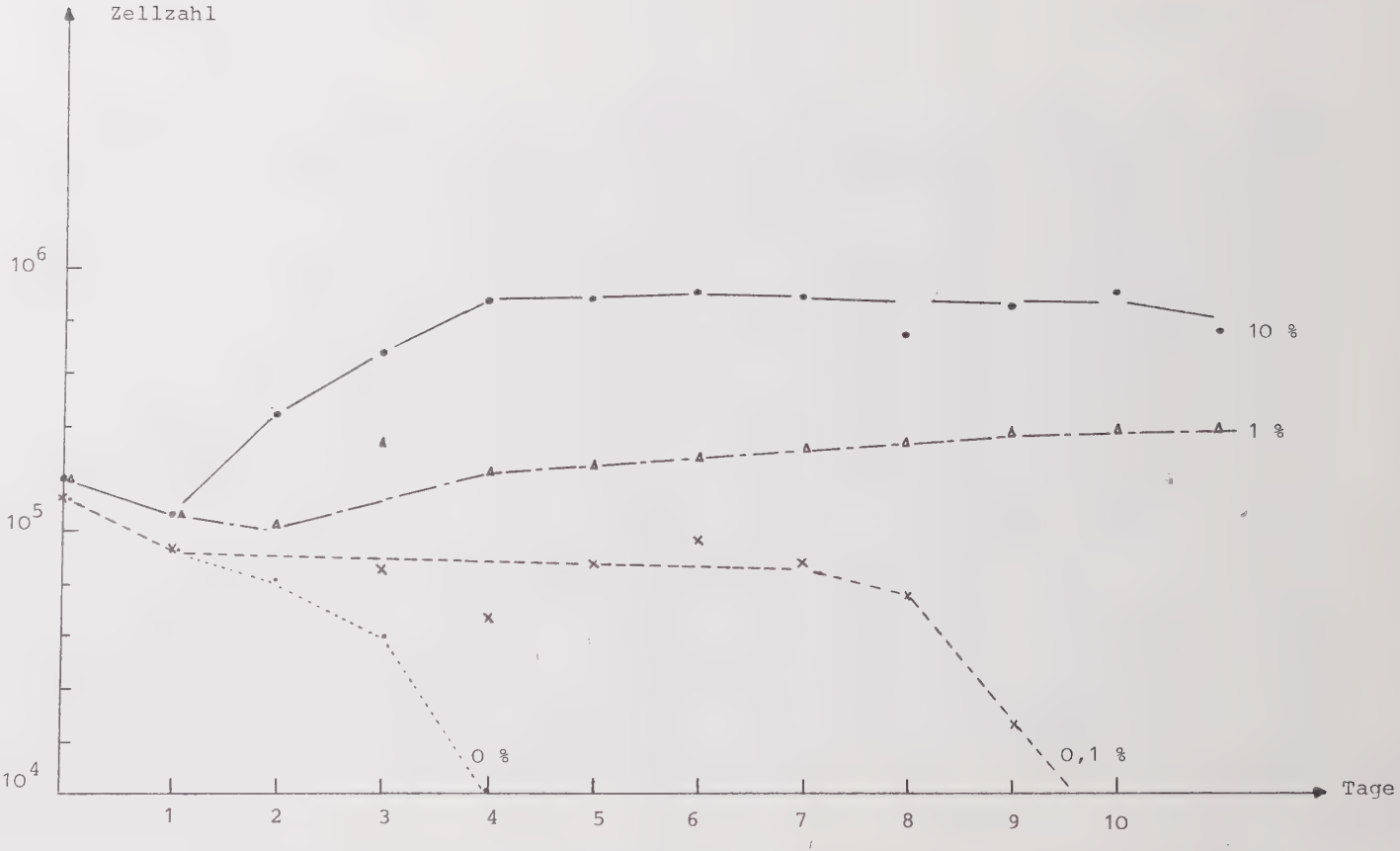


Abb. 14: Wachstumskurve von Mesenchymzellen bei verschiedenen FKS-Konzentrationen

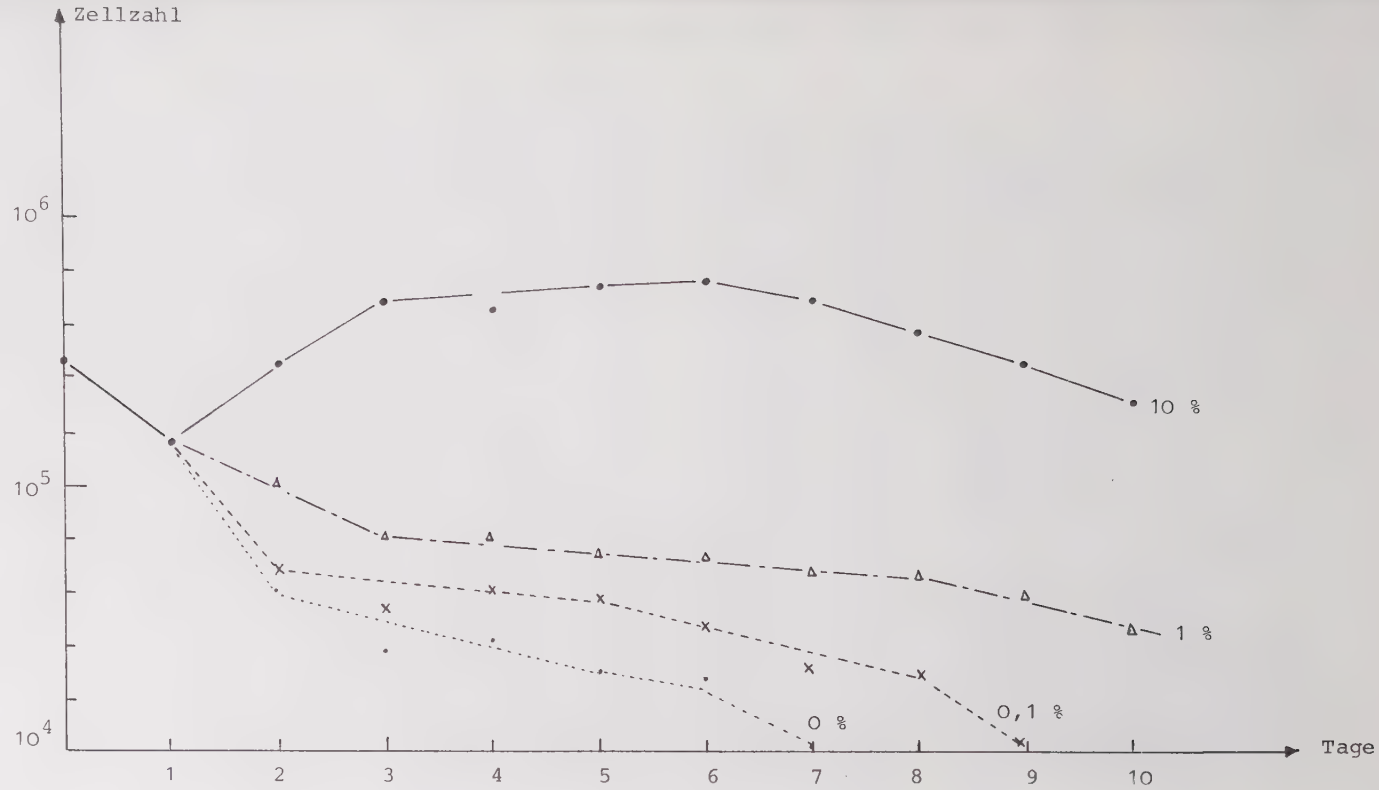


Abb. 15: Wachstumskurve von Osteoblasten bei verschiedenen FKS-Konzentrationen

Die Abhängigkeit des Zellwachstums von der Serumkonzentration ist aus den Wachstumskurven deutlich sichtbar. Die folgenden allgemeinen Feststellungen können gemacht werden: Wird dem Nährmedium kein Serum beigefügt, so sterben die Zellen schnell ab, ohne sich vermehrt zu haben. Bei 0,1 % Serum ist ebenfalls kein Wachstum möglich, jedoch kann der Zelltod etwas hinausgezögert werden. Mit 1 % Serum können die Zellen über 10 Tage am Leben erhalten werden, jedoch finden kaum Zellteilungen statt. Bei beiden Zelltypen findet erst bei 10 % Serum ein günstiges Zellwachstum statt. Die Zellen vermehren sich, bis eine maximale Zellzahl erreicht ist. Bleibt diese Zahl über einige Tage erhalten, wie es bei den Mesenchymzellen der Fall ist, spricht man von einer stationären Wachstumsphase. Parallelversuche zeigten, daß höhere Serumkonzentrationen von 15 oder 20 % das Wachstumsverhalten nicht weiter verbessern.

In der folgenden Aufstellung werden die Wachstumskurven der Mesenchymzellen und der Osteoblasten verglichen.

Serum-konzentration	Mesenchymzellen	Osteoblasten
10 %	maximale Zellzahl am 4. Tag erreicht, die Zellzahl hält sich über die folgenden 6 Tage, es besteht eine stabile stationäre Wachstumsphase.	maximale Zellzahl am 6. Tag erreicht, die Zellen beginnen sich zu vermindern, ohne eine stationäre Phase eingegangen zu sein.
1 %	nach anfänglichem Absinken sinken der Zellzahl (2. Tag) erholen sich die Zellen und halten eine stationäre Phase mit sogar leicht steigender Tendenz über die folgenden Tage an.	die Zellen beginnen langsam abzusterben, ab dem 3. Tag ist eine stationäre Phase mit sinkender Tendenz über einige Tage festzustellen.
0,1 %	die Zellzahl hält sich über die ersten 7 Tage in derselben Höhe, um dann rapide abzunehmen.	die Zellzahl sinkt kontinierlich ohne eine stationäre Phase durchlaufen zu haben.
0 %	die Zellen sterben rasch ab, am 4. Tag haben sich alle Zellen von der Unterlage gelöst.	die Zellzahl nimmt rasch ab, ab dem 3. Tag halten sich noch einige Zellen für weitere 3 Tage am Leben, es sind jedoch kleine verkümmerte Zellen ohne Fortsätze.

Die Untersuchung zeigt, daß sich die beiden Zellarten auch bei der idealen Serumkonzentration von 10 % Serum bereits in ihrer Wachstumsgeschwindigkeit und in der erreichten maximalen Zellzahl unterscheiden. Die Osteoblasten vermehren sich langsamer und erreichen nie die Zellzahl der Mesenchymzellen. Auch bei niedrigerer Serumkonzentration oder Serumentzug reagieren sie empfindlicher, die Absterbephase setzt früher ein.

5.6 Identifikation der Zelltypen mittels verschiedener Färbemethoden

Im LM ist es möglich, die Mesenchymzellen und die Osteoblasten aufgrund ihrer spezifischen Morphologie zu unterscheiden. Zur Hervorhebung der Strukturen der Zelle und des Zellkernes ist die Osmiumfixierung geeignet. Abb. 16 zeigt Mesenchymzellen 12 Stunden nach der Subkultivierung. Die Zellen haben sich an die Unterlage angeheftet und sind zur Proliferation bereit. Die Mesenchymzellen sind charakterisiert durch einen schlanken ausgezogenen Zelleib mit langen dünnen Plasmafortsätzen, die wie eine Verlängerung der Zelle erscheinen. Die in manchen Kernen aufgelockerte Struktur zeigt die beginnende Mitose an.

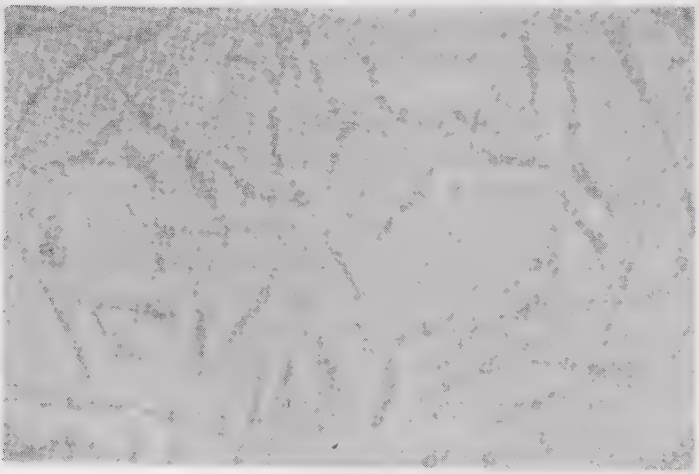


Abb. 16: Mesenchymzellen (Osmium-Fixierung) 12 Std. nach Subkultivierung

Um die Zellen im gleichen Entwicklungsstadium darzustellen, wurden die Osteoblasten entsprechend ihrer Verdoppelungszeit, die aus der Wachstumskurve entnommen werden kann, etwas später fotografiert. Abb. 17 zeigt einzelne Osteoblasten 20 Stunden nach der Subkultivierung. Hier wurde die May-Grünewald-Färbemethode angewendet, die ebenfalls eine bessere Strukturdarstellung erlaubt und bei der die Zellkerne durch eine blau-violette Anfärbung hervorgehoben werden. Die Osteoblasten haben einen großen plumpen Zelleib mit einem ebenfalls großen Zellkern, der meistens etwas exzentrisch liegt. Die wenigen Zytoplasmafortsätze erscheinen zu dem plumpen Leib recht filigran.

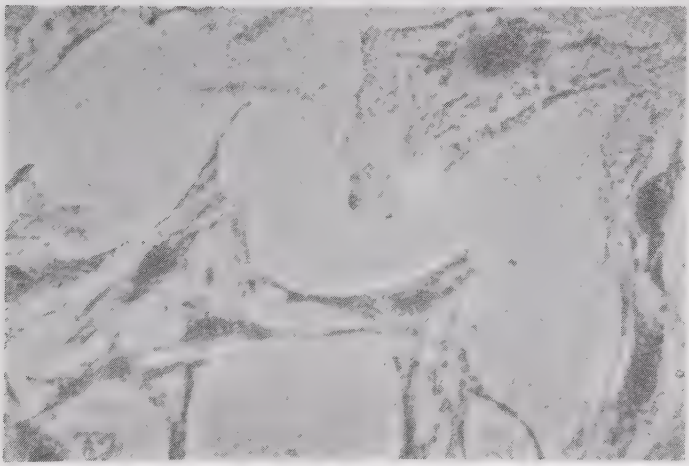


Abb. 17: Osteoblasten (May-Grünewald-Färbung), 20 Std. nach Subkultivierung

Wenn nach einem bzw. zwei Tagen die Zellteilung eingesetzt hat, bietet die Unterscheidung der Zelltypen etwas mehr Schwierigkeiten. Die Zellen liegen in höherer Dichte vor und die spezifische Form der Einzelzelle ist nicht mehr so gut, allerdings bei einiger Erfahrung, immer noch ausreichend erkennbar. Abb. 18 zeigt Mesenchymzellen einen Tag nach der Subkultivierung. Die Proliferationszentren erkennt man an den Anhäufungen von Zellkernen.

Abb. 18: Mesenchymzellen einen Tag nach Subkultivierung, mit Proliferationszentren (May-Grünewald-Färbung)

Abb. 19 zeigt Osteoblasten 2 Tage nach der Subkultivierung. Es bildet sich bereits ein zusammenhängender Zellrasen. Ein Proliferationszentrum

von Osteoblasten wurde bereits in Abb. 6 gezeigt.

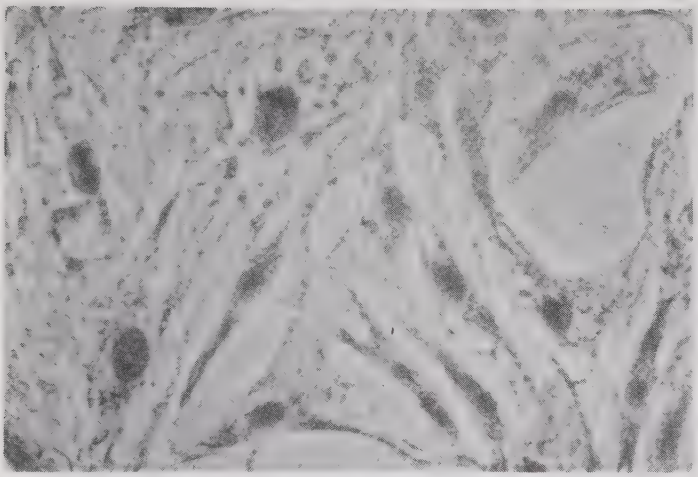


Abb. 19: Osteoblasten, 2 Tage nach Subkultivierung (May-Grünewald-Färbung)

Nach zwei bzw. drei Tagen ist der Zellrasen bereits so dicht, daß die einzelnen Zellen nicht mehr erkannt werden könne. Aufgrund eines unterschiedlichen Gesamtbildes ist eine Identifikation der beiden Zelltypen trotzdem möglich. Während die Mesenchymzellen in fast parallelen Bahnen angeordnet sind, bilden die Osteoblasten nämlich eher wabenartige Strukturen.

Außer der enzymatischen Bestimmung der alkalischen Phosphatase gibt es noch eine Färbemethode, die es erlaubt, die Syntheseorte dieses Enzyms sichtbar zu

machen. Mit der alkalischen Phosphatasefärbung werden diese Stellen in der Zelle dunkelbraun angefärbt. Abb. 20 zeigt Osteoblasten mit einer intensiv braun angefärbten Zone um den Kern herum und weiteren kleinen dunklen Punkten, die keine festgelegte Ordnung erkennen lassen.

Abb. 20: Osteoblasten mit Syntheseorten der alk. Phosphatase in alkalischer Phosphatase-Färbung

Im Gegensatz zu den Osteoblasten gibt es bei den Mesenchymzellen keine eindeutigen dunkelgefärbten Stellen (Abb. 21). Bei den kleinen einzelnen dunklen Punkten, die diffus in der Zelle verteilt sind, könnte es sich um Stellen mit wenig alkalischer Phosphatase handeln, entsprechend der geringen Aktivität, die bei der enzymatischen Bestimmung

nachgewiesen wurden. Ebensogut könnte es sich um Artefakte handeln.

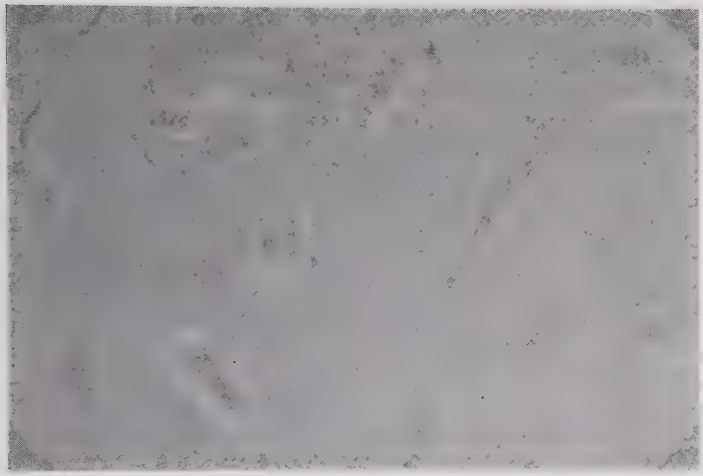


Abb. 21: Mesenchymzellen in alk. Phosphatase-Färbung, kein eindeutiger Nachweis von alk. Phosphatase

Durch den Nachweis der alkalischen Phosphatase ist es eindeutig gelungen, die Osteoblasten zu identifizieren.

5.7 Wirkung der Testsubstanz OCG auf die Mesenchymzellen

Die meisten der OCG-Partikeln, die am dritten Tag nach der Umsetzung in die Mesenchymzellkultur gegeben wurden, wuchsen in den dichten Zellteppich ein. Nach etwa vier Tagen konnte festgestellt werden, daß die Zellen, die sich in der Nähe der Partikeln befanden, eine Änderung ihrer Gestalt erfahren hatten. Der dichte Zellrasen lockerte sich an diesen Stellen auf. Die vorher nicht mehr einzeln erkennbaren Zellen lagen weniger dicht vor, waren größer und einzeln abgrenzbar, ließen sich jedoch nicht eindeutig identifizieren. Sie waren zwar kleiner als Osteoblasten, allerdings auch nicht so schlank wie die Mesenchymzellen. Vom Gesamteindruck her waren sie eher letzteren zuzuordnen (Abb. 22).

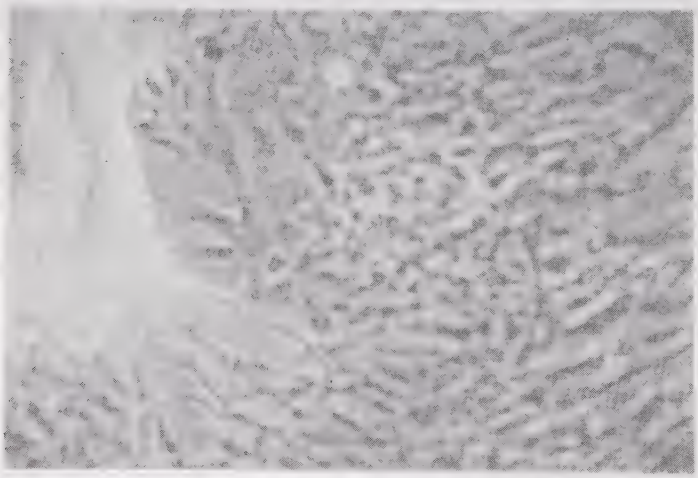


Abb. 22: Zellen um ein OCG-Partikel

Durch die Auflockerung der die Partikeln umgebenden Zellen änderte sich auch das Gesamtbild. Die vorher parallel ausgerichtete, dichte Zellstruktur wurde unterbrochen durch lichte Stellen, wo die Zellen mehr netzartig angeordnet waren (Abb. 23).

Abb. 23: Mesenchymzellen mit OCG-Partikeln: Auflockerung der Zellstruktur

Aufgrund der morphologischen Umgestaltung kann geschlossen werden, daß die Mesenchymzellen durch die OCG-Partikeln beeinflußt wurden. Ob es sich bei diesen veränderten Zellen um osteoblastenähnliche Zellen handelt oder ob sie abartige Mesenchymzellen darstellen, die durch die Fremdkörper in ihrer Ordnung gestört worden sind, kann allein aufgrund der lichtmikroskopischen Untersuchung

nicht festgestellt werden. Nicht auszuschließen wäre auch, daß von der OCG ein toxischer Effekt ausgeht, der zu gestörtem Zellwachstum führt und daher die Zellauflockerung bewirkt.

Die Anwendung der alkalischen Phosphatase-Färbung, die zur Identifikation von Osteoblasten geeignet ist, brachte keine Klärung. Aus der diffusen Braunfärbung der Zellen können keine spezifischen Syntheseorte der alkalischen Phosphatase, die bei den Osteoblasten klar darstellbar sind, erkannt werden (Abb. 24).

Abb. 24: Anwendung der alkalischen Phosphatase-Färbung auf die durch OCG-Partikeln veränderten Mesenchymzellen

Als weiteres Bestimmungskriterium zur Einordnung dieser veränderten Zellen wurde enzymatisch die alkalische Phosphatase-Aktivität bestimmt. Bei den drei Proben die noch zur Verfügung standen, konnte eine um eine Zehnerpotenz höhere Aktivität festgestellt werden als bei den Mesenchymzellen, die kein OCG enthielten. In der folgenden Tabelle sind die Werte der Phosphatasebestimmung aufgeführt:

Mesenchymzellen mit OCG-Partikeln 10 mg	Volumenaktivität U/ml	Proteingehalt mg/ml	spezifische Aktivität U/mg
1. Probe	0,03648	0,116	0,314
2. Probe	0,0288	0,108	0,266
3. Probe	0,0053	0,078	0,067

Einen Vergleich der durchschnittlichen spezifischen Aktivität von Mesenchymzellen und Osteoblasten zeigt die nächste Tabelle:

Mesenchymzellen mit OCG	Mesenchymzellen	Osteoblasten (30 Tage alt)
0,216 U/mg	0,012 U/mg	1,789 U/mg

Die im Vergleich zu den Mesenchymzellen deutlich erhöhte Aktivität deutet darauf hin, daß in der Kultur Osteoblasten oder osteoblastenähnliche Zellen entstanden sind, die alkalische Phosphatase produzieren. Die niedrige Aktivität im Vergleich mit den Osteoblasten ist erklärbar, wenn berücksichtigt wird, daß - wie im LM beobachtet - nur ein Teil der Mesenchymzellen eine Transformation erfahren hat.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die OCG bei einem Teil der kultivierten Mesenchymzellen eine Änderung hervorgerufen hat. Diese veränderten Zellen sind jedoch weder im LM noch durch die alkalische Phosphatase-Färbung eindeutig zu identifizieren. Aufgrund der erhöhten alkalischen Phosphatase-Aktivität kann aber gesagt werden, daß es sich nicht mehr um eine reine Mesenchymzellkultur handelt, sondern daß mindestens ein Teil der Zellen eine Umwandlung in Osteoblasten oder zumindest in "Osteoblast-like cells" erfahren haben. Somit kann die induktive Wirkung der OCG bestätigt werden.

6 DISKUSSION

Noch immer bieten die Säugerzellen erhebliche Schwierigkeiten bei der Kultivierung. Die Zellen sind komplex und durch ihre zarte Plasmamembran vulnerabel und stellen weit höhere Ansprüche an ein Nährmedium als Mikroorganismen. Tatsächlich kennt man ihre Bedürfnisse noch nicht einmal in allen erforderlichen Einzelheiten (FEDER und TOLBERT 1983). Die Schwierigkeit der Kultivierung besteht darin, daß die Säugerzelle kein eigenständiger Organismus ist, sondern vielmehr darauf spezialisiert ist als Teil eines organisierten Gewebeverbandes zu leben. Die Zelle hängt ab von anderen, ebenfalls spezialisierten Zellen sowie einem Kreislaufsystem, das ihr ein genau abgestimmtes stabiles Lebensmilieu gewährleistet. Es ist daher für die Zelle gegen ihre Natur, wenn sie losgelöst aus ihrem Zellverband in einem künstlichen Medium leben und sich vermehren soll.

Viele unkontrollierte Parameter und schon kleine Variationen bei den Kultivierungsmethoden können sich auf das Gelingen einer Kultur auswirken, so daß auch bei Verwendung bekannter Methoden eigene Erfahrungen unabdingbar sind (YAFFEE 1973). Auch in der vorliegenden Arbeit mußten einige Ansätze und Vorversuche gemacht werden, um sich außer den technischen Fertigkeiten auch die mehr auf Erfahrung beruhenden Kenntnisse, z. B. bei der Beurteilung des Wachstums oder des Aussehens der Zellen, anzueigenen. Erst durch wiederholtes Beobachten war es möglich, das normale, d. h. unter den vorgegebenen Bedingungen übliche Verhalten und Aussehen zu beurteilen und Abweichungen davon zu bemerken.

Ziel der Arbeit war es, die Wirkung der in Kap. 4.1 beschriebenen OCG in Zellkulturen zu überprüfen. Bei der Implantation in die Abdominalmuskulatur von Ratten bewirkte diese OCG die Bildung von Knorpelgewebe, war also in vitro erwiesenermaßen biologisch aktiv. Diese induktive Wirkung der OCG sollte nun unter kontrollierten Bedingungen modellhaft in der Zellkultur untersucht werden. Dazu mußte als erstes eine Zellart kultiviert werden, die die Möglichkeit zu einer Veränderung hat. Wie aus der Literatur zu entnehmen ist, eignen sich dazu u. a. die Mesenchymzellen, die relativ problemlos aus fetaler oder neonataler Muskulatur in Primärkultur gezüchtet werden können (z. B. URIST 1970-79). Diese Zellen, die im lebenden Organismus schon zu Myoblasten oder Fibroblasten differenziert waren, nehmen unter Kulturbedingungen in kürzester Zeit wieder ein undifferenziertes Stadium an. Die von YAFFEE (1973) beobachtete Entwicklung der kultivierten Muskelzellen zu funktionsfähigem Muskelgewebe ist offenbar bei URIST nie aufgetreten und konnte auch bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten nie festgestellt werden. Wenn nicht ideale Bedingungen vorliegen, die es den differenzierten Muskelzellen ermöglichen, ihre spezifischen Eigenschaften aufrecht zu erhalten, tendieren sie offensichtlich dazu, ihre Ursprungsform anzunehmen.

Als nächstes mußte die Zellart, die durch die induzierende Wirkung der OCG entstehen sollte, nämlich die Osteoblasten, auf ihre Kulturbedingungen, ihr Wachstumsverhalten und ihre spezifischen Erkennungskriterien untersucht werden. Im Gegensatz zu den Muskelzellen, die die Möglichkeit haben, sich in kurzer Zeit den Kulturbedingungen anzupassen,

indem sie die Struktur der einfacheren Mesenchymzellen annehmen, haben die hochdifferenzierten Osteoblasten offenbar diese Möglichkeit nicht. Entweder müssen die Kulturbedingungen so optimal sein, daß sie ihre spezifische Form und Funktion aufrecht erhalten können, oder aber sie sind gar nicht kultivierbar, degenerieren und sterben ab. Für die Osteoblasten wurde die Kultivierungsmethode von BINDERMANN ET AL. (1974) übernommen, bei der alle bisher bekannten Faktoren berücksichtigt wurden, die ein zufriedenstellendes Wachstum der Osteoblasten garantieren sollten. Anhand der Beobachtungen am Wachstumsverhalten der kultivierten Zellen wurde versucht, die Unterschiede zwischen den Mesenchymzellen und den Osteoblasten aufzuzeigen.

Einige Eigenschaften, wie das langsamere Zellwachstum zu Beginn der Kultur oder die längere Proliferationszeit bis zur Subkultivierung der Osteoblasten, zeigten die Schwierigkeit dieser Zellen, losgelöst aus ihrem Zellverband zu gedeihen und sich zu vermehren. Sie könnten aber auch als typisch für die jeweilige Zellart angesehen werden. Die meisten Eigenschaften scheinen allerdings eher allgemeingültig zu sein für das unterschiedliche Verhalten von hochdifferenzierten sensiblen Zellen wie den Osteoblasten, die auf beabsichtigte oder unbeabsichtigte Veränderungen der Kulturbedingungen sofort reagieren, und von einfacher strukturierten Zellen wie den Mesenchymzellen, die relativ unempfindlich sind. In den durchgeführten Experimenten erwies sich die Toleranzgrenze zwischen Gedeihen und Nichtgedeihen bei den Osteoblasten im Gegensatz zu den Mesenchymzellen als sehr gering. So vermehrten sie sich nur, wenn sie in hoher Zellzahl ausgesät wurden. Sie wurden auch nicht so alt wie die

Mesenchymzellen und ihre Bereitschaft zur Proliferation nahm mit zunehmendem Alter ab. Besonders deutliche Unterschiede ergaben sich bei den Wachstumskurven. Die Mesenchymzellen zeigten, außer der höheren und schneller erreichten maximalen Zellzahl, eine stabile stationäre Phase, und zwar nicht nur bei 10 % Serum, sondern auch bei suboptimalem Serumangebot. Dagegen sank die Osteoblastenzahl sogar bei 10 % Serum gleich nach Erreichen einer maximalen Höhe wieder ab. Die abfallenden Linien der graphischen Darstellung bringen den Kampf der Osteoblasten um das Überleben zum Ausdruck. Die optimale Serumkonzentration ist für das Wachstum der Osteoblasten offensichtlich entscheidend, wobei die genaue Rolle des Serums allerdings nicht bekannt ist. Man weiß nur, daß es notwendig ist für das Überleben und die Vermehrung der Zellen in einem künstlichen Medium.

Außer den bekannten Forderungen, welche Osteoblasten in Kultur stellen und die bei den ausgeführten Experimenten so gut wie möglich erfüllt wurden, spielten auch unbekannte Bedürfnisse eine entscheidende Rolle. Was unter Einhaltung der von BINDERMANN (1974) vorgegebenen Methode nicht nachvollzogen werden konnte, nämlich die Entwicklung der Osteoblasten zu Knochengewebe, gelang, als der normalerweise 5 % betragende CO_2-Gehalt der Begasungsluft über längere Zeit auf 2 % absank. Über die Bedeutung des CO_2-Gehaltes in der Begasungsluft auf die Knochenbildung konnte in der Literatur keine Angaben gefunden werden. MAHGOUB UND STERN (1974) stellten lediglich fest, daß bei Medien mit ganz bestimmten Proteinzustäzen die Knochenresorption bei 5 % CO_2-Gehalt größer ist als bei 0,6 %. Dieses Resultat würde prinzipiell,

wenn auch unter den einschränkenden Bedingungen, dem vorliegenden Ergebnis entsprechen. Würde nämlich bei höherem CO_2-Gehalt eine gesteigerte Knochenresorption stattfinden, so sollte umgekehrt die Knochenformation durch einen niedrigeren CO_2-Gehalt gesteigert werden. Ob in den vorliegenden Experimenten der andauernde niedrige CO_2-Gehalt entscheidend war oder ob das Absinken in einer ganz bestimmten Entwicklungsphase der Osteoblasten als Stimulus gewirkt hat, kann nicht gesagt werden. Ein Hinweis für die letztere Möglichkeit könnte darin gesehen werden, daß die Entwicklung nicht reproduzierbar war.

In der Literatur wird allerdings allgemein bestätigt, daß Reproduzierbarkeit von Versuch zu Versuch sehr schwer zu erzielen ist (PAUL 1980). Als häufigste Gründe für entscheidende Variationen werden Unterschiede zwischen den verwendeten Medien und Unterschiede zwischen den Zellen genannt. Um diese Unterschiede auf ein Minimum zu beschränken, sollte immer dasselbe Medium während der ganzen Versuchsreihe benutzt werden. Gleiche Zellarten können sich im physiologischen Zustand und in der genetischen Konstitution unterscheiden. Es ist bekannt, daß Zellen in Kultur zu genetischen Änderungen neigen. Um dies zu verhindern, wäre es sinnvoll, eine genügend große Menge an Zellen derselben Charge herzustellen und einzufrieren. Diese beiden Punkte wurden in der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt und könnten daher als eine Ursache für die Nichtreproduzierbarkeit angesehen werden.

Die Wirkung der OCG konnte geprüft werden, nachdem durch die Vorarbeiten die notwendigen Voraussetzungen und Hilfsmittel geschaffen waren: Es lagen undifferenzierte Zellen vor, die für verschiedene

Entwicklungen offen waren; die Voraussetzungen für das Gedeihen der Knochenzellen waren geschaffen; die Beurteilung der Zellen konnte anhand der Morphologie, der alkalischen Phosphatase-Färbung und der enzymatischen Bestimmung der alkalischen Phosphatase-Aktivität erfolgen. Die Morphologie allein ist sicher ein ungenügendes Kriterium zur Feststellung der Identität einer Zelle. So konnte bei den Zellen in der Nachbarschaft der OCG-Partikeln festgestellt werden, daß eine Änderung stattfand, jedoch konnte diese Zellveränderung allein aufgrund der lichtmikroskopischen Untersuchung nicht beurteilt werden. Auch mit der alkalischen Phosphatasefärbung konnte die Zellart nicht eindeutig bestimmt werden. Anstelle der für Osteoblasten erwarteten braunen Stellen um den Zellkern zeigte sich eine diffuse Braunfärbung der ganzen Zelle, die weder für Mesenchymzellen noch für Osteoblasten typisch ist.

Erst anhand der gegenüber den Mesenchymzellen deutlich erhöhten alkalischen Phosphatase-Aktivität, die als gesichertes Erkennungskriterium für Chondro- und Osteoblasten gilt (OSBODY UND CAPLAN 1981), konnte nachgewiesen werden, daß eine Anzahl von Kulturzellen eine Transformation in Richtung Chondro- oder Osteoblasten erfahren hatten. Wie aus der Literatur hervorgeht, sind durch die induktive Wirkung der KM bisher nur Chondroblasten, jedoch noch nie Osteoblasten, hervorgegangen, (z. B. URIST 1970-79, NATANSON UND HAY 1980). Vermutlich handelt es sich bei den alkalische Phosphatase produzierenden Zellen in dem hier durchgeführten Experiment ebenfalls um Chondroblasten. Es ist bekannt, daß sich die Chondro- und Osteoblasten in ihrem genetischen Potential

nicht unterscheiden und daß für die Entwicklung der Mesenchymzellen zu Chondro- oder Osteoblasten nur die umgebenden Faktoren (O_2-Gehalt, Vaskularisierung, Druck) entscheidend sind. Folglich kann angenommen werden, daß eine Entwicklung zu Osteoblasten aufgrund der ungenügenden Kulturbedingungen nicht möglich war. Es gelingt zwar, funktionsfähige Osteoblasten zu kultivieren, eine Überführung von Chondroblasten in Osteoblasten wurde jedoch unter Kulturbedingungen noch nicht erreicht.

Da in den Mesenchymzellen der vorliegenden Experimente immer nur minimale alkalische Phosphatase-Aktivität nachgewiesen wurde, kann die beobachtete Entwicklung dieser Zellen zu enzymproduzierenden Chondroblasten auf die induzierende Wirkung der OCG zurückgeführt werden. Aus der Beobachtung, daß nur die Zellen in der Umgebung der OCG-Partikel eine sichtbare morphologische Änderung erfuhren und daß die alkalische Phosphatase-Aktivität niedrigere Werte aufwies als die reinen Osteoblastenkulturen, kann geschlossen werden, daß nur ein Teil der Zellen induziert wurde. Einige mögliche Ursachen hierfür werden im folgenden erläutert:

- Es wäre möglich, daß bei den noch nicht sichtbar veränderten Zellen der Induktionsprozeß noch nicht vollständig abgelaufen war und das Enzym daher noch nicht freigesetzt werden konnte. Wie schwierig die Erfassung der ersten Anzeichen einer induzierten Zelle ist, wurde in der Literatur beschrieben. Die von AINSWORTH (1977) durchgeführte Bestimmung der Chondroitinschwefelsäure und des Hyaluronsäure scheinen nicht zu genügen. Es wäre daher sinnvoll, die Beurteilung durch das EM miteinzubeziehen und die Entwicklung an den sich verändernden Organellen zu verfolgen.

- Die induktive Wirkung der OCG kann zu schwach gewesen sein und daher nur einen Teil der Zellen beeinflußt haben. Grund für die ungenügende Wirkung der OCG könnte z. B. sein, daß ein Teil der Aktivität durch die Sterilisierungsbehandlung zerstört wurde, oder daß die OCG aus den Knochen alter Spendertiere aufbereitet wurde, die keine hohe Aktivität mehr entfalten können.

- Die Aufarbeitungsform der OCG könnte ungeeignet sein, so daß z. B. toxische Rückstände die Zellen beeinflußt haben könnten.

- Die Kontaktdauer der OCG mit den Zellen könnte nicht ausreichend gewesen sein, eine Induktion hätte bei längerem Kontakt noch erfolgen können.

- Die zu den Kulturen gegebene Menge an OCG hätte inadäquat sein können. Bei zu wenig Substanz hätte der Induktionseffekt zu schwach sein können, bei zuviel hätten toxische Effekte die Induktion verhindern können.

- Obwohl in der Literatur beschrieben ist, daß die induzierende Substanz löslich ist (z. B. URIST 1973, ANASTASSIADES 1978), hätte diese bei dem speziellen, geprüften Stoff nicht ausreichend in Lösung gehen müssen. Damit wäre verständlich, daß nur die Zellen beeinflußt wurden, die mit den Partikeln direkten Kontakt hatten.

Die Klärung dieser Punkte müßte in weiteren Experimenten vorgenommen werden, in denen die aufgezählten Faktoren einzeln variiert werden. Da bekannt ist, wie empfindlich das ganze Zellkultursystem u. U. auf geringe Variationen reagiert, können nur durch weitere Experimente die günstigsten Bedingungen herausgefunden werden.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Nachdem es URIST 1970 zum ersten Mal gelungen ist, kultivierte Mesenchymzellen durch den Einfluß von demineralisierter Knochenmatrix in Chondroblasten zu überführen, die Knorpelgewebe bildeten, wurden zum Thema der Induktion weitere Arbeiten geleistet. Ein Beitrag dazu liefert auch die vorliegende Arbeit, deren Ziel es war, die nach einem bestimmten Herstellungsverfahren gewonnene demineralisierte Knochenmatrix (OCG) auf ihre biologische Aktivität in Zellkulturen zu prüfen. Dazu wurden Muskelzellen neonataler Ratten kultiviert, die sich unter den Kulturbedingungen in die weniger anspruchsvollen Mesenchymzellen umwandelten. Außerdem wurden Osteoblasten kultiviert, die von neonatalen Rattencalvarien stammten, um die Kulturbedingungen und das Verhalten dieser spezialisierten Zellen zu studieren. Als Unterscheidungskriterien dieser beiden Zellarten eigneten sich die Wachstumskurven, die Morphologie, die alkalische Phosphatase-Färbung und die enzymatische Bestimmung der alkalischen Phosphatase. Diese Nachweismethoden wurden an den kultivierten Zellen erprobt. Schließlich wurde die Wirkung der OCG getestet, indem ca. 20 mg dieser Substanz in Form von Partikeln ($< 400\ \mu g$) für 21 Tage in die Kultur gegeben wurde. Nach dieser Zeit konnten im LM in der Umgebung der Partikeln veränderte Zellen festgestellt, jedoch nicht identifiziert werden. Die für die Osteoblasten typischen Syntheseorte der alkalischen Phosphatase konnten mit der geeigneten Färbung nicht aufgezeigt werden. Hingegen war die enzymatisch bestimmte alkalische Phosphatase-Aktivität bedeutend höher als den reinen Mesenchymzellen, jedoch nicht so hoch wie bei den reinen Osteoblasten. Aufgrund dieses Wertes konnte angenommen werden, daß sich ein Teil der

Mesenchymzellen in alkalische Phosphatase produzierende Zellen, wahrscheinlich in Chondroblasten, umgewandelt hatte. Die OCG hat somit durch ihre induktive Wirkung eine Transformation der einfachen Mesenchymzellen in die höher differenzierten Chondroblasten bewirkt. Um weitergehende Ergebnisse zu erzielen, z. B. klare morphologische Verhältnisse, höhere Enzymaktivität, Entwicklung zu Osteoblasten, müßten weitere Versuche unter Variationen der Kulturbedingungen vorgenommen werden.

8 LITERATURVERZEICHNIS

ABDIN M. and FRIEDENSTEIN A.Y.:
Electron Microscopic Study of Bone Induction by the Transitional Epithelium of the Bladder in Guinea Pigs
Clinical Orthopaedics and Related Research, 82, 182-194 (1972)

AINSWORTH T., PUZIC O. and ANASTASSIADES T.:
The Effect of Bone Matrix on Young Connective Tissue Cells in Culture
J. Lab. Clin. Med., 781-791 (4/1977)

ANASTASSIADES T., PUZIC O. and PUZIC R.:
Effect of Solubilized Bone Matrix Components on Cultured Fibroblasts Derived from Neonatal Rat Tissues
Calcif. Tiss. Res., 26, 173-179 (1978)

ANDERSEN KARL:
Embryologie
Troponwerke (1965)

BASSET C.A.L. and HERRMANN L.:
Influence of Oxygen Concentration and Mechanical Factors on Differentiation of Connectiv Tissue in vitro
Nature, Lond. 190, 460-61 (1961)

BASSETT C.A.L.:
Current Concepts of Bone Formation
J. Bone Jt. Surg., 44A, 1217-44 (1962)

BINDERMANN I., DUSKIN D., HARTELL A., KATZIR E. and SACHS L.:
Formation of Bone Tissue in Culture from Isolated Bone Cells
Journ. of Cell Biology, 61, 427-39 (1974)

BOURNE G.
Phosphatase and Calcification
In "The Biochemistry and Physiology of Bone"
Vol. III, 79-120, Academic Press New York, 1974

BUCHER OTTO:
Cytologie, Histologie und mirkoskopische Anatomie des Menschen
Verlag Haus Huber (1977)

BURCK HANS-CHRISTIAN:
Histologische Technik
Thieme Verlag Stuttgart (1973)

CAMERON D.A.:
The Ultrastructure of Bone
Biochemistry and Physiology of Bone
Academic Press N. Y. (1976)

CHEN L.B., MAITLAND N., GALLIMORE P.H. and MCDOUGALL J.K.:
Detection of the Large External Transformation - Sensitive Protein on Some Epithlial Cells
Exp. Cell Research, 106, 39-46 (1977)

COHN D.U. and WONG G.L.:
Isolated Bone Cells
Skeletal Research: An Experimental Approach,
Edited by David J. Simmons, Arthur S. Kunin,
Academic Press (1979)

FEDER J. und TOLBERT W.R.:
Säugerzellen in Massenkultur
Spektrum der Wissenschaft, 44-52 (3/1983)

FITTON-JACKSON S.:
The Fine Structure of Developing Bone in the Embryonic Fowl
Proc. Roy Soc. (Biol) 146, 270 (1957)

FLEISCH H.:
Physiologie und Biochemie der Knochenbildung
Klinische Wochenschrift, 44. Jahrgang, 7. Heft, 360-363 (1966)

FLEISCH H., RUSSEL R. and FRANCES M.:
Diphosphonates Inhibit Hydroxy Apatite Dissolution in vitro and Bone Resorption in Tissue Culture and in vitro
Science 165, 1262-1264 (1969)

FROST H.M.:
Cell Generation Systems: A New Concept in Medecine
Henry Ford Hosp. Med. Bull., 11, 391-408 (1963)

HADORN E.:
Experimentelle Entwicklungsforschung
Springer Verlag (1970)

HALL B.K.:
Cellular Differentiation in Skeletal Tissues
Biol. Rev., 45, 455-484 (1970)

HANAMURA H., URIST MARSHALL R.:
Osteogenesis and Chondrogenesis in Transplants of Dunn and Ridgway Osteosarcoma Cell Cultures
Amerc. J. of Pathology, Vol. 91, No. 2, 277-290 (1978)

IGARASHI Y. and YAOI Y.:
Growth - Enhancing Protein Obtained from Cell Surface of Cultured Fibroblasts
Nature, 254, 248-250 (1975)

JOHNSON, L.C.:
Morphological Analysis in Pathology: the Kinetics of Disease and General Biology of Bone
In Bone Biodynamics, 543-654, Ed. H.M. Frost, Boston: Little, Brown and Co. (1964)

KARLSON PETER:
Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler
Thieme Verlag, Stuttgart, 1974

KÜHN ALFRED:
Grundriß der allgemeinen Zoologie
Georg Thieme Verlag Stuttgart (1964)

KURODA Y.:
Studies on Cartilage Cells in vitro
Experimental Cell Research 35, 326-336 (1964)

LOWRY O.H., ROSEBROUGH, FARR A.L. and RANDALL R.Y.:
Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent
J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1953)

MAHGOUB AHMED and STERN PAULA H.:
Carbon Dioxide and the Effect of Parathyroid Hormone on Bone in vitro
Amerc. Journal of Physiology, Vol. 226, No. 6, 1272-1275 (1974)

MATSUTANI ETSUYA and KURADOA YUKIAKI:
Effect of Cell Association on in vitro Chondrogenesis of Mesenchyme Cells from Quail Limb Buds
Cell Structure and Function, 5, 239-246 (1980)

MUENZENBERG K.J. und DENNERT R.:
Die zellunabhängige Beeinflussung der Calcifikation im lebenden Knochengewebe und in vitro
Arch. orthop. Unfall-Chir., 82, 157-168 (1975)

NATHANSON MARK A., HILFER ROBERT S. and SEARLS ROBERT L.:
Formation of Cartilage by Non-Chondrogenic Cell Types
Developmental Biology, 64, 99-117 (1978)

NATHANSON MARK A. and HAY ELISABETH D.:
Analysis of Cartilage Differentiation from Skeletal Muscle Grown on Bone Matrix
Developmental Biology, 78, 301-351 (1980)

NAKAGAWA MASAMI and URIST MARSHALL R.:
Chondrogenesis in Tissue Cultures of Muscle Under the Influence of a Diffusible Component of Bone Matrix
Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medecine, 154, 568-572, (1977)

NOGAMI H. and URIST M.R.:
A Substratum of Bone Matrix for Differentiation of Mesenchymal Cells into Chondro-Osseous Tissues in vitro
Exp. Cell Res., 63, 404-410 (1970)

OSDOBY PHILIP and CAPLAN ARNOLD I.:
Characterisation of a Bone-Specific Alkaline Phosphatase in Chick Limb Mesenchymal Cell Cultures
Developmental Biology 86, 136-146 (1981)

PAUL JOHN
Zell- und Gewebekulturen
Walter de Gruyter, Berlin, New York (1980)

PECK W.A., BIRGE S.J. and FEDAK S.A.:
Bone Cells: Biochemical and Biological Studies after Enzymatic Isolation
Science 146, 1476 (1964)

PRITCHARD J.J.:
General Histology of Bone
Biochemistry and Physiology of Bone
Academic Press N.Y. (1976)

RANSCHT BÄRBEL
Untersuchungen zum Wachstum und zur Differenzierung von Nervenzellen in Kultur
Diplomarbeit des Fachbereiches Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen (1979)

REDDI A.H. and HUGGINS CHARLES:
Biochemical Sequences in the Transformation of Normal Fibroblasts in Adolescent Rats
Proc. Nat. Acad. Su. USA, 69 (No. 6), 1601-1605 (1972)

REDDI A.H. and ANDERSON WINSTON A.:
Collagenous Bone Matrix - Induced Endochondral Ossification and Hemopoiesis
The Journal of Cell Biology, 69, 557-572 (1976)

REYNOLDS John R.:
Skeletal Tissue in Culture
Biochemistry and Physiology of Bone
Academic Press N. Y. (1976)

ROMEIS BENNO:
Mikroskopische Technik
R. Oldenbourg Verlag München/Wien (1968)

SCHNEIDER E.L., MITSUI Y., AU K.S. and
STUART SHORR S.:
Tissue - Specific Differences in Cultured Human
Diploid Fibroblasts
Exp. Cell Research 108, 1-6 (1977)

STERN PAULA H. and RAISZ LAWRENCE G.:
Organ Culture of Bone
Skeletal Research, an experimental approach
Academic Press N.Y. (1979)

TASWELL H.F. and JEFFERS D.M.:
Isoenzymes of Serum Alkaline Phosphatase in
Hepatobiliary and Skeletal Disease
The American Journal of Clinical Pathology,
40, 349-356 (1963)

TERASHIMA Y. and URIST M.R.:
Bromodeoxyuridine - Inhibition of Substratum -
Controlled Chondrogenesis
Proceedings of the Society for Experimental
Biology and Medecine 146, 855-856 (1974)

TONNA E.A. and CRONKITE E.P.:
An Autoradiographic Study of Periosteal Cell
Proliferation with Tritiated Thymidine
Lab. Invest. 11, 455-462 (1962)

URIST M.R.:
The Regulation of Calcium and Other Ions in the Serums of Hagfish and Lampreys
Ann. N.Y. Acad. Sci., 109, 294-311 (1963)

URIST MARSHALL R.:
Bone: Formation by Autoinduction
Science, 150, 893-899 (1965)

URIST MARSHALL R. and NOGAMI HIROSHI:
Morphogenetic Substratum for Differentiation of Cartilage in Tissue Culture
Nature, 225, 1051-1052 (1970)

URIST MARSHALL R.:
Enzymes in Bone Morphogenesis: Endogenous Enzymic Degradation of the Morphogenetic Property in Bone Solutions Buffered by EDTA
In: Hard Tissue Growth, Repair and Remineralisation. Ciba Foundation Symposium 11 (new series)
Associated Scientific Publishers, 143-160 (1973)

URIST M.R., NOGAMI H. and THERASHIMA Y.:
A Substratum of Bone Matrix Gelatin for Chondrogenesis in Tissue Culture and in vivo
In: Extracellular Matrix Influences on Gene Expression, Edited by H.C. Slavkin, R.C. Greulich, Academic Press, 609-618 (1975)

URIST MARSHALL R., DELANGE ROBERT Y., FINERMAN G.A.M.
Bone Cell Differentiation and Growth Factors
Science, 220, 680 - 686 (1983)

VOGEL GÜNTHER, ANGERMANN HARTMUT:
d t v-Atlas zur Biologie
Band 1 + 2, d t v (1967)

WILKINSON J.:
In "Isoenzymes" (J. Wilkinson, ed.)
69-102, Chapman + Hall, London (1970)

WILLIAMS D.C., BODER G.B., TOOMEY, R.E., PAUL D.C., HILLMAN C.C., KING K.L., FRANKE R.M. and JOHNSTON C.C.:
Mineralisation and Metabolic Response in Serially Passaged Adult Rat Bone cells
Calcif. Tissue Int. 30 233-246 (1980)

WONG G.L., LUBEN R.A. and COHN D.:
1,25-Dihydroxycholecalciferol and Parathormon: Effects on Isolated Osteoclast - Like and Osteoblast - Like Cells
Science 197, 663-665 (1977)

YAFFEE DAVID:
Rat Skeletal Muscle Cells
Tissue Culture: Methods and Application
Ed. by Paul F. Kruse
Academic Press, N. Y. (1973)

L E B E N S L A U F

Am 3. August 1950 wurde ich, Elisabeth Bürger geb. Buchli, als drittes und jüngstes Kind meiner Eltern Konrad und Margrit Buchli in Chur (Schweiz) geboren. Mein Vater war Primarlehrer, meine Mutter Hausfrau, vor ihrer Heirat Krankenschwester. Nach sechs Jahren Primar- und drei Jahren Sekundarschule besuchte ich das Lehrerseminar in Rorschach, wo ich die Ausbildung zur Primarlehrerin 1970 abschloss. Diesen Beruf übte ich dreieinhalb Jahre aus. Gleichzeitig bereitete ich mich auf dem zweiten Bildungsweg im Fernstudium auf die Matura vor, mit dem Ziel, Medizin zu studieren. Im Herbst 1975 bestand ich die Eidgenössische Maturitätsprüfung. Anschliessend studierte ich zwei Semester Medizin an der Universität Neuchâtel.

1976 heiratete ich Manfred Bürger. Da mein Mann Deutscher ist und als Physiker an der Universität Stuttgart arbeitet, setzte ich mein Studium in Tübingen fort.

Nach dem Praktischen Jahr am Lehrkrankenhaus Esslingen und in der Neurologischen Klinik der Universität Tübingen bestand ich am 20. Oktober 1982 das medizinische Staatsexamen.